

Vorhersage der subzellulären Verteilung von Enzymaktivitäten im  
Erbsensamen auf Basis von Expressionsdaten

# **Bachelorarbeit**

Autor:                   Veronika Peter  
Hochschule Mittweida

Mittweida 2011

# Bachelorarbeit

Vorhersage der subzellulären Verteilung von Enzymaktivitäten im  
Erbsensamen auf Basis von Expressionsdaten

eingereicht von:      Veronika Peter  
Hochschule Mittweida  
Biotechnologie/Bioinformatik, 7. Semester  
Matrikelnummer: 21571

Hochschulbetreuer:      Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers

Praktikumsbetreuer:      Dr. Björn Junker

Einreichung:              Mittweida, 14.09.2011

Verteidigung:             Mittweida, 2011

## Kurzbeschreibung

Die Erbse (*Pisum sativum*) wird aufgrund ihrer charakteristischen Biomassezusammensetzung als Modellorganismus für zahlreiche Stoffwechseluntersuchungen verwendet. Beispielsweise werden mithilfe von Enzymassays und den damit ermittelten kinetischen Parametern die Stoffwechselwege in mathematischen Modellen zusammengefasst. Speziell für die Erbse wurde in der vorliegenden Arbeit die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) diverser Enzyme zweier Pflanzen mit unterschiedlichem Genotyp, Wildtyp Eiffel und RNAi AGP3, analysiert. Auswirkungen der gentechnischen Veränderung fielen besonders bei dem direkt betroffenen Enzym auf. Die Modifikation des Genotyps erfolgte durch eine RNA-Interferenz, wodurch eine verminderte Genexpression mit einer reduzierten Enzymaktivität vorlag. Bei der Untersuchung des Saccharoseabbaus und der Stärkesynthese zeigten sich außerdem veränderte Aktivitäten der Phosphoglucose Isomerase, der Saccharose Synthase und anderen analysierten Enzymen. Mithilfe eines Microarrays, bei denen die Genexpression der eben genannten Erbsengentypen analysiert wurde, und den darin enthaltenen Oligonukleotid-Sequenzen einzelner Isoformen wurde in verschiedenen Datenbanken nach homologen Sequenzen gesucht. Die neuen Sequenzen wurden dann in die Webapplikationen TargetP 1.1 und WoLF PSORT zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung eingesetzt. Allerdings erwiesen sich die Ergebnisse als unpräzise, da die Sequenzen unvollständig waren. Durch Expressionsdaten wurde die Signalstärke der Isoenzyme prozentual ermittelt und anhand von  $v_{max}$  auf die Verteilung der einzelnen Aktivitäten geschlossen. Diese Methode war jedoch sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur oder Erntezeitpunkt. Daher ist es sinnvoll nach wesentlich genaueren Vorgehensweisen zur Vorhersage der subzellulären Verteilung von Enzymaktivitäten zu suchen.

## **Danksagungen**

Ich bedanke mich von Seiten der Hochschule Mittweida bei meinem Betreuer Herrn Röbbbe Wünschiers für seine Unterstützung. Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Systembiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben (IPK), besonders an den Arbeitsgruppenleiter Björn Junker und an meine Betreuerin Tiina Liiving, ebenso an Simon Weber, Hart Poskar und Kai Schallau. Des Weiteren bedanke ich mich bei Astrid Junker von der Pflanzenbioinformatik sowie bei Kathleen Weigelt aus der Gruppe Heterosis. Weiterhin geht ein Dank an Volodymyr und Ruslana Radchuk von der Samenentwicklung des Leibniz-Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung. Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit bedanke ich mich zu guter Letzt bei dem Bundesministerium für Forschung und Bildung.

## Inhaltsverzeichnis

Kurzbeschreibung .....	
Danksagungen.....	
Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Zielstellung.....	1
1.2 <i>Pisum sativum</i> .....	2
1.2.1 Samenentwicklung.....	3
1.2.2 Saccharoseabbau und Stärkesynthese im Erbsensamen .....	4
1.3 Enzymkinetik.....	6
1.4 RNAi AGP3.....	9
1.5 Microarray.....	11
1.6 Expressed-Sequence-Tag (EST) .....	12
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Pflanzenmaterial .....	14
2.1.2 Chemikalien .....	14
2.1.3 Enzyme und Puffer.....	17
2.1.4 Geräte .....	18
2.1.5 Datenbanken und interaktive Webprogramme .....	19
2.2 Methoden .....	20
2.2.1 Anbau der Pflanzen.....	20

2.2.2 Enzymextraktion .....	20
2.2.3 Enzym-Assays.....	21
2.2.4 Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit.....	23
2.2.5 Lokalisierung der Enzyme und ihrer Aktivitäten.....	25
3 Ergebnisse .....	27
3.1 $v_{max}$ - und $K_M$ -Vergleich im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3 .....	27
3.2 Subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten.....	31
3.2.1 Verteilung der Aktivitäten auf die Enzymisoformen .....	31
3.2.2 Vorhersage der subzellulären Enzymverteilung .....	33
3.3 Zusammenhang von gemessener Aktivität und Expressionsstärke .....	35
4 Diskussion .....	37
4.1 $v_{max}$ - und $K_M$ -Vergleich im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3 .....	37
4.2 Subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten.....	40
4.2.1 Verteilung der Aktivitäten auf die Enzymisoformen .....	40
4.2.2 Vorhersage der subzellulären Enzymverteilung .....	42
4.3 Zusammenhang von gemessener Aktivität und Expressionsstärke .....	45
4.4 Fazit .....	46
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	49
Literaturverzeichnis .....	51
Anhang .....	VII
Anhang A: Grundlagen.....	VIII
Anhang B: Ergebnisse.....	XII
Anhang C: Diskussion .....	XVII
Selbstständigkeitserklärung.....	XIX

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablaufschema des Saccharoseabbaus und der Stärkesynthese im Cytosol und Plastid der Erbse .....	5
Abbildung 2: Irreversible Reaktion eines Enzyms mit einem einzelnen Substrat .....	7
Abbildung 3: Michaelis-Menten-Kurve (modifiziert nach Bisswanger, 2008).....	8
Abbildung 4: Schema der möglichen Inhibierungswege .....	9
Abbildung 5: Schematisches Beispiel eines 2-Farben-cDNA-Microarrays.....	12
Abbildung 6: Verteilung der Gesamtaktivität auf die einzelnen Enzyme in der Wildform und in der transgenen Erbse.....	28
Abbildung 7: Vergleich der Aktivitätskurven der AGPase im WT und in der RNAi AGP3....	29
Abbildung A.1: Schema des Binärvektors PZP200 mit eingefügtem Konstrukt .....	X
Abbildung A.2: MA-Diagramm eines 2-Farben-Microarrays .....	XI
Abbildung B.1: Unkompetitive Hemmung der Hexokinase (Fructose) .....	XII
Abbildung C.1: Strukturformeln von Fructose und Glucose .....	XVII
Abbildung C.2: Ergebnisse von WoLF PSORT zur Sequenz von AGPase 1 .....	XVIII

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der maximalen Enzymgeschwindigkeiten im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3 .....	27
Tabelle 2: $K_M$ -Werte der untersuchten Enzyme im Wildtyp und der RNAi AGP3 .....	28
Tabelle 3: Maximale Reaktionsgeschwindigkeiten der untersuchten Isoenzyme im Wildtyp und im Embryo mit verändertem Genotyp .....	33
Tabelle 4: Zusammenfassung der vermutlichen Enzym-Lokalisierung in der Zelle.....	35
Tabelle 5: Normalisierter M-Wert der untersuchten Enzyme in RNAi AGP3 und Wildtyp .	36
Tabelle A.1: Zusammenfassung drei verschiedener Inhibierungsarbeiten mit Fließschemen und Ratengleichungen .....	IX
Tabelle B.1: Gegenüberstellung von $t_{Vers}$ und $t_{krit} (v_{max})$ .....	XIII
Tabelle B.2: Vergleich von $t_{Vers}$ und $t_{krit} (K_M)$ .....	XIII
Tabelle B.3: Aktivitäten der Enzyme bzw. ihrer Isoformen, prozentual angegeben.....	XIV
Tabelle B.4: Voraussage der Verteilung auf die verschiedenen Kompartimente der Zelle mittels WoLF PSORT.....	XV
Tabelle B.5: Vorhersage der subzellulären Enzymverteilung mittels TargetP 1.1 .....	XVI



## Abkürzungsverzeichnis

A/S	Substrat
ADP	Adenosindiphosphat
AGPase	ADP-Glucose Pyrophosphorylase
alk	alkalisch
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	complementary DNA/komplementäre DNS
DAF	days after flowering/ Tage nach der Blüte
DNA	deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
$\Delta E$	Extinktionsänderung
E	Enzym
EA	Enzym-Substrat-Komplex
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylglycoltetraessigsäure
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute
EST	Expressed Sequence Tag
Frc	Fructose
Frc6P	Fructose-6-Phosphat
FW	fresh weight/Frischgewicht
Glc	Glucose
Glc1P	Glucose-1-Phosphat
Glc6P	Glucose-6-Phosphat
Glc6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
I	Inhibitor

Inv	Invertase
iPPase	anorganische Pyrophosphatase
mRNA	messenger RNA
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaPPi	Natriumpyrophosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P	Produkt
PGI	Phosphoglucose Isomerase
PGM	Phosphoglucomutase
Pi	Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPi	Pyrophosphat
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
siRNA	small interfering RNA
SuSy	Saccharose Synthase
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UGPase	UDP-Glucose Pyrophosphorylase
UTP	Uridintriphosphat
$v$	Reaktionsgeschwindigkeit
$VF$	Verdünnungsfaktor
$v_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

Aufgrund ihres hohen Eiweißgehalts sind Samen der Leguminosen eine wichtige Proteinquelle. Gerade in Entwicklungsländern wie in Afrika, in denen ein großer Teil der Bevölkerung infolge hoher Lebensmittelpreise an qualitativer und quantitativer Unterernährung leidet [Nwokolo & Smartt, 1996], spielen Leguminosen eine wichtige Rolle, denn sie liefern den Menschen essentielle Aminosäuren. Auch für die Tiermast sind Leguminosen (u.a. Erbse und Sojabohne) von Bedeutung. In Europa werden für die Herstellung tierischer Produkte große Mengen an pflanzlichen Eiweißen gebraucht. Diese werden größtenteils aus der Sojabohne gewonnen [URL-1], welche hauptsächlich durch Import aus Brasilien und anderen südamerikanischen Ländern stammt [URL-2] [URL-3].

Die wichtigste Leguminosenart für den Anbau in gemäßigttem Klima ist die Erbse (*Pisum sativum*). Da sie einen humusreichen Boden und ein wärmeres Klima benötigt, kann in den mitteleuropäischen Ländern kein optimaler Ertrag erzielt werden. In Ländern der Dritten Welt wird das Problem der qualitativen Unterernährung zusätzlich durch die steigende Bevölkerung verstärkt, wodurch es umso wichtiger ist, nach Optimierungsmöglichkeiten der Erbse zu forschen. Zwar gibt es Alternativen wie die Sojabohne, diese kann aber wegen des Klimas und ihres großen Flächenbedarfs nur begrenzt in vorhandenen Gebieten angebaut werden [URL-1].

Die Optimierung der Erbse kann zum Beispiel durch mathematische Modelle unterstützt werden, die einen Einblick in die Stoffwechselwege geben. Allerdings sind hierfür kinetische Parameter wie Metabolitkonzentrationen und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten der Enzyme ( $v_{max}$ ) nötig, die experimentell bestimmt werden müssen. Aufgrund ihrer Handlichkeit und der Übertragbarkeit ihrer Ergebnisse auf andere Leguminosen wird die Erbse deshalb häufig als Modellpflanze für Optimierungen verwendet.

## 1.1 Zielstellung

Da der Erbsenembryo zu mehr als 50 % aus Kohlenhydraten (vorrangig Stärke mit bis zu 80 % und zu 20 % Saccharose) besteht, ist das Ziel, den primären Stoffkreislauf, den Saccharoseabbau und die Stärkesynthese zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten die

Enzymaktivitäten zweier Erbsengenotypen, Wildtyp (WT) Eiffel und die Transgene RNAi AGP3, bestimmt und miteinander verglichen werden. Da bei der transgenen Pflanze das Enzym ADP-(Adenosindiphosphat) Glucose Pyrophosphorylase mittels siRNA (small interfering Ribonucleic acid) genetisch verändert wurde und deshalb auf direktem Weg weniger Stärke produziert wird, sollten die Auswirkungen auf den Abbau der Saccharose und die kinetischen Parameter im Erbsensamen untersucht werden. Beispielsweise werden überschüssige Kohlenstoffe der Saccharose für die Aminosäuresynthese genutzt. Für die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten wurden Assays entwickelt, deren Reaktionsweg stets zu Glucose-6-Phosphat (Glc6P) verläuft. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc6PDH) wandelt Glc6P anschließend zu Gluconolacton um, wobei  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamadenindinukleotid) bzw.  $\text{NADP}^+$  (Nicotinamiddinukleotidphosphat) zu NADH oder NADPH reduziert wird. Die untersuchten Enzyme sind: ADP- und UDP-(Uridindiphosphat) Glucose Phyrophosphorylase (AGPase: Enzyme Commission (EC) 2.7.7.27, UGPase: EC 2.7.7.9), anorganische Pyrophosphatase (iPPase: EC 3.6.1.1), Hexokinase (HK: EC 2.7.1.1), alkalische Invertase (alk Inv: EC 3.2.1.16), Phosphoglucomutase (PGM: EC 5.4.2.2), Phosphoglucose Isomerase (PGI: EC 5.3.1.9) sowie Saccharose Synthase (SuSy: EC 2.4.1.13).

Anschließend sollten die einzelnen Enzymisoformen mit Hilfe ihrer Sequenzen und Lokalisierungstools bestimmten Kompartimenten zugeordnet werden. Durch die vereinfachte Annahme, dass sich die Signalstärke von Expressionsdaten und die Enzymaktivitäten linear verhalten, kann dann auf die subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten geschlossen werden.

## **1.2 *Pisum sativum***

Die Erbse (*Pisum sativum*) ist eine der ältesten Kulturpflanzen und zählt zu der Familie der Hülsenfrüchtler, den Fabaceae oder Leguminosae. Sie wurde erstmals vor rund 8000 Jahren in Vorderasien und dem östlichen Griechenland angebaut [URL-4]. *Pisum sativum* zeichnet sich vor allem durch ihre Biomassezusammensetzung aus. Sie besteht je nach Sorte und Umweltbedingungen zu über 50 % aus Kohlenhydraten und zu etwa 20-25 % aus Eiweißen [Weigelt, 2010], im Gegensatz dazu sind Fette und Zellwandbestandteile mit ca. 2 % und etwa 5 % kaum vertreten.

Das Besondere an der Erbse ist wie bei allen Leguminosen ihre Fähigkeit, mit Rhizobien (Knöllchenbakterien) Symbiosen einzugehen. Diese Bakterien sind in der Lage, den in der Luft vorhandenen Stickstoff zu binden und ihn der Erbse als Nitrat, eine für die Pflanze biologisch nutzbare Form, zu überführen. Im Gegenzug liefert die Erbse aus der Umwandlung aufgenommener Kohlenhydrate Energie, die für die Stickstofffixierung der Rhizobien nötig ist [URL-5].

### **1.2.1 Samenentwicklung**

Wachsende Samen der Erbse, bestehend aus dem maternalen Gewebe (Samenhülle oder Testa), filialen Embryo und Endosperm, sind genetisch und physiologisch heterogen [Weber *et al.*, 2005]. Die Testa spielt eine besondere Rolle bei dem Transfer von Nährstoffen in den Embryo. Zum einen produziert sie große Mengen Arginin für die spätere Embryoentwicklung (Embryogenese), zum anderen akkumuliert Stärke schon frühzeitig in der Testa, um dann in den sich entwickelten Embryo überführt zu werden [Casey & Davies, 1993]. Somit hat sie großen Einfluss auf das Wachstum des Embryos und möglicherweise sogar auf Qualität und Quantität der Speicherprodukte wie Eiweiße, Fette und Kohlenhydrate.

Die Entwicklung des Erbsensamens besteht aus drei Phasen: Zelldifferenzierung, Reife- bzw. Speicherungsphase und der anschließenden Austrocknung [Weber *et al.*, 2005]. Die Übergänge der Stadien sind durch zwei Lag-Phasen gekennzeichnet [Casey & Davies, 1993]. Das erste Stadium beginnt mit der Befruchtung und endet mit dem Ausfüllen der Testa. In diesem Schritt bilden sich Endosperm und Testa vor allem durch Zellteilung. Außerdem werden Spross- und Wurzelmeristeme sowie die Kotyledonen angelegt. [Weigelt, 2010]. Dieses Stadium zeichnet sich durch eine hohe mitotische Aktivität aus, die in der nächsten Phase wieder sinkt. Am Ende der Zelldifferenzierung beginnen die Protein- und Stärkereserven innerhalb der Kotyledonen zu akkumulieren [Munier-Jolain *et al.*, 2010]. Junge Samenhüllen bilden somit bis zur vollkommenen Ausreifung vorübergehend das Speichergewebe [Weber *et al.*, 2005]. Anschließend folgt die erste Lag-Phase, die durch den Rückgang des Wachstums im Endosperm und in der Testa verursacht wird. Daraufhin wird das zweite Stadium, die Samenreifung, eingeleitet, bei der hauptsächlich der Embryo sein Volumen durch Zellstreckungswachstum vergrößert

[Weigelt, 2010]. Dieser hat seine maximale Größe erreicht, sobald das flüssige Endosperm verbraucht ist und der Erbsenembryo direkten Kontakt zu der Testa besitzt [Casey & Davies, 1993]. Das bedeutet, dass die Größe des Embryos mit dem maximalen Volumen des Endosperms korreliert [Weber *et al.*, 2005]. Die nötigen Nährstoffe für das Wachstum werden über Testa und Endosperm geliefert. Zudem wird die Samenreifung durch Speicherstoffakkumulation und dem Erwerb der Austrocknungstoleranz begleitet [Weigelt, 2010]. Im letzten Stadium beginnt die Austrocknung. Hier wird die Dehydrierung initiiert [Weber *et al.*, 2005; Borisjuk *et al.*, 2003], das bedeutet, dass der Samen ständig Wasser verliert, bis der maximale Austrocknungsgrad erreicht ist. Außerdem werden die Aktivitäten im Stoffwechsel und der Gene minimiert [Weigelt, 2010].

### **1.2.2 Saccharoseabbau und Stärkesynthese im Erbsensamen**

Wie schon unter 1.2 erwähnt, verfügt der reife Erbsensamen über eine charakteristische Biomassezusammensetzung. Über 50 % besteht aus Kohlenhydraten, davon ist zu etwa 80 % Stärke enthalten. Hierbei handelt es sich um ein Polysaccharid das sich wiederum zu 20-30 % aus Amylose und 70-80 % aus Amylopektin zusammensetzt [Smith *et al.*, 1995]. Die anderen 20 % der Kohlenhydrate umfassen beispielsweise Saccharose, Glucose und andere Saccharide. Als Speicherstoff dient die Stärke als wichtiger Energie- und Kohlenstofflieferant in der Erbse [Weigelt, 2010]. Eine besondere Bedeutung haben demzufolge die Stärkesynthese sowie der Saccharoseabbau, da Saccharose die Grundlage für die Produktion der Stärke bildet. Außerdem handelt es sich bei ihr um den Hauptzucker zum Transport von Kohlenstoffen, daher wird sie häufig als Startpunkt für Modellierungen verwendet [Rohwer & Botha, 2001; Uys *et al.*, 2007].

Die Erbsensamen sind mixotrophe Organe, das heißt, sie betreiben neben der heterotrophen Ernährung auch Photosynthese [Weber *et al.*, 2005]. Daher ist die Saccharose eine Primärquelle für den Metabolismus und das Wachstum des Embryos. Sie wird vorwiegend in der Fruchthülse synthetisiert und über das Phloem zum Embryo transportiert. Einen Überblick über den Abbau der Saccharose bis hin zur Stärkeentwicklung und -speicherung in Plastiden der Erbse gibt Abbildung 1 wieder.

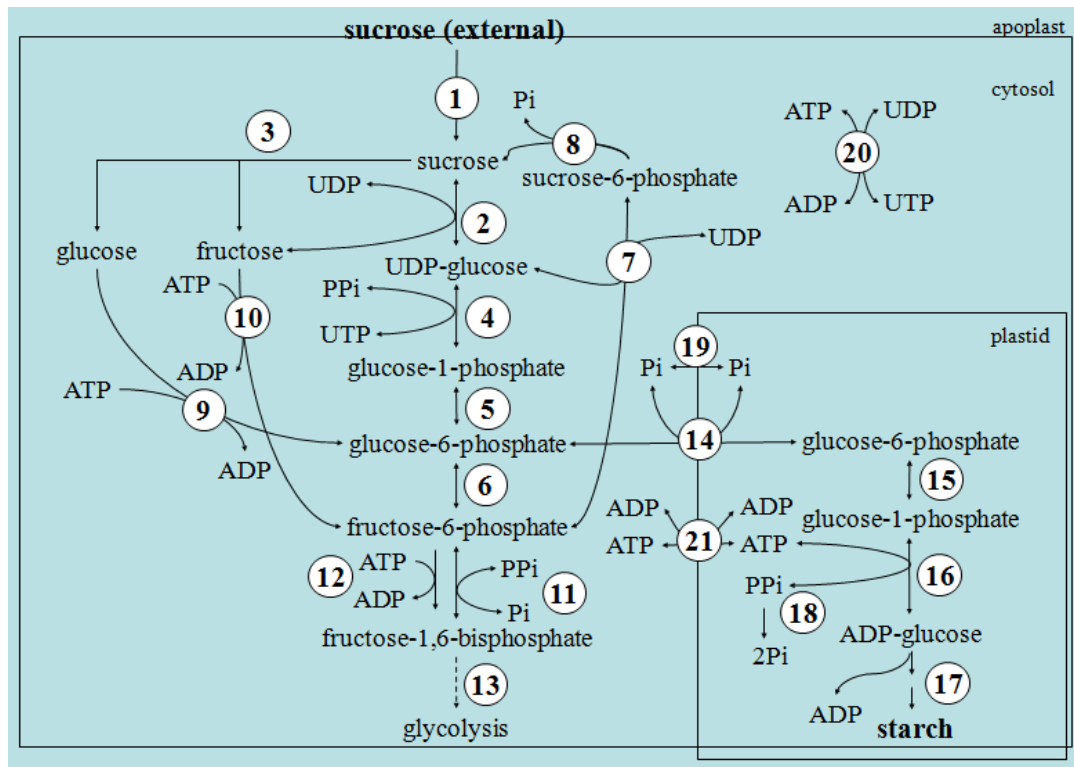


Abbildung 1: Ablaufschema des Saccharoseabbaus und der Stärkesynthese im Cytosol und Plastid der Erbse. (1) summarischer Saccharose-Import, (2) Saccharosesynthase, (3) Invertase, (4) UGPase, (5) Phosphoglucumutase, (6) Phosphoglucoisomerase, (7) Saccharosephosphatsynthase, (8) Saccharosephosphatphosphatase, (9) Glucokinase/Hexokinase, (10) Fructokinase, (11) Phosphofructophosphatase, (12) Phosphofructokinase, (13) summarische Glykolyse, (14) Glucosephosphat-Transporter, (15) plastidäre Phosphoglucumutase, (16) AGPase, (17) Stärkesynthase, (18) plastidäre Pyrophosphatase, (19) Phosphatdiffusion, (20) NDPkinase, (21) ADP/ATP-Translokator (Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat-Translokator)

Saccharose, deren Bildung während der Photosynthese in grünen Blättern stattfindet [Weigelt, 2010], wird über die Zellwand in das Cytosol aufgenommen. Dort kann die Saccharose nun entweder durch eine Invertase zu Glucose (Glc) und Fructose (Frc) oder durch Saccharose-Synthasen zu UDP-Glucose sowie Fructose hydrolytisch gespalten werden. Die Saccharosespaltung wird hauptsächlich durch letzteres Enzym katalysiert. Es ist zudem noch in der Lage neue Saccharose zu synthetisieren, indem die Reaktion reversibel abläuft. Die entstandene UDP-Glucose der Hinreaktion und das im Cytosol vorhandene Pyrophosphat (PPi) können nun durch die UGPase zu Glucose-1-Phosphat (Glc1P) umgesetzt werden, welches sowohl wieder zurück als auch mithilfe von PGM zu Glucose-6-Phosphat (Glc6P) reagieren kann. Glc6P entsteht außerdem aus der Phosphorylierung von Glucose durch Hexokinasen. Ebenso können durch dieses Enzym

Phosphatgruppen an die Fructose gebunden werden, sodass Fructose-6-Phosphat (Frc6P) entsteht. Das dafür benötigte Phosphat stammt von ATP. Das gebildete Frc6P wird dann zu Fructose-1,6-Bisphosphat verstoffwechselt, indem die Reaktion von Phosphofructophosphatase katalysiert wird. Das Produkt wird über mehrere Schritte der Glykolyse letztendlich zu den Triosephosphaten, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat, umgewandelt [Weigelt, 2010]. Frc6P ist aber auch im Stande, durch die Saccharosephosphat Synthase zu UDP und Saccharose-6-Phosphat zu reagieren, wobei letzteres durch die Saccharosephosphat Phosphatase in Saccharose und Phosphat gespalten wird. Mittels der Phosphoglucose Isomerase wird Frc6P zu Glc6P umgesetzt. Glc6P wird über einen Glucosephosphat-Transporter in das Plastid importiert, um durch PGM zu Glc1P umgeformt zu werden. Bei diesem Prozess wird angenommen, dass das Phosphat (Pi) durch die Plastidmembran diffundieren kann, um den Konzentrationsgradienten auszugleichen. Gleichzeitig wird Glucose-6-Phosphat über den Transporter, welcher als Antiport dient, in das Plastid hinein transportiert.

Das in Plastiden enthaltene Glucose-1-Phosphat wird nun durch die AGPase zu ADP-Glucose verarbeitet, welches unter ATP-Verbrauch zu Stärke reagiert. Im letzten Schritt bilden Stärkesynthasen und Verzweigungsenzyme die komplexe Struktur von Amylopektin und Amylose [Weigelt, 2010]. Die Stärke wird als Speicherstoff akkumuliert, wobei ein Teil für die Stoffwechsellagerhaltung während der Nacht verbraucht wird. Die in der Zelle vorhandenen Nukleotide Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat, Uridintriphosphat und Uridindiphosphat (ATP, ADP, UTP und UDP) können durch NDPkinasen stets ineinander umgeformt werden, um so für weitere Reaktionen zur Verfügung zu stehen. Fast alle Reaktionsschritte im Saccharoseabbau und in der Stärkesynthese sind Umkehrreaktionen. Um welche es sich genau handelt, kann der Abbildung 1 entnommen werden.

### **1.3 Enzymkinetik**

Die Enzymkinetik befasst sich hauptsächlich mit der enzymatischen Katalyse von chemischen Reaktionen. Solche können in verschiedene Ordnungen unterteilt sein. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist vor allem von der Konzentration der teilnehmenden Komponenten abhängig. Je nach Anzahl dieser werden Reaktionen erster, zweiter oder



dritter Ordnung unterschieden. Somit wird die Gesamtreaktionsordnung aus der Anzahl aller beteiligten Substrate definiert. Die einfachste mögliche Reaktion ist die Umwandlung eines Substrats in ein Produkt (erste Ordnung). Bei Reaktionen zweiter Ordnung werden zwei Substrate, bei Reaktionen dritter Ordnung drei Substrate in ein Produkt umgesetzt [Bisswanger; 2008].

Eine vereinfachte Beschreibung der Enzymkinetik wurde 1913 durch die Biochemiker Michaelis und Menten entwickelt. Die Michaelis-Menten-Gleichung galt vorerst für die einfachste irreversible Enzymreaktion, bei der ein einzelnes Substrat katalytisch in ein Produkt umgewandelt wird (Abbildung 2). Beispiele solcher Reaktionen sind Isomerisierungen oder Spaltungsreaktionen.

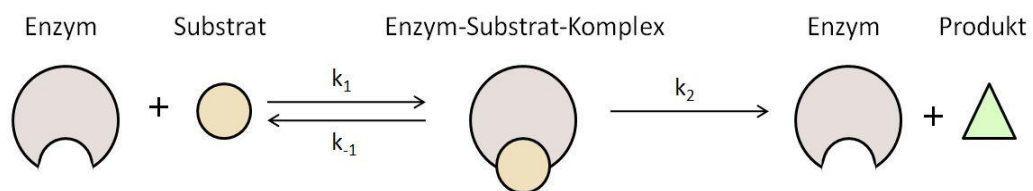


Abbildung 2: Irreversible Reaktion eines Enzyms mit einem einzelnen Substrat. Dabei bildet das Enzym mit dem Substrat einen Enzym-Substrat-Komplex, der entweder zerfällt oder ein Produkt abspaltet, wobei das Enzym danach wieder in seiner Ausgangsform vorliegt. Die Reaktion ist in mehrere Teilreaktionen unterteilt, die mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$ ,  $k_{-1}$  und  $k_2$  bezeichnet werden.

Substrat und Enzym sind in der Lage zu einem Enzym-Substrat-Komplex (ES) zu reagieren. Dieser kann ein Produkt irreversibel bilden und abspalten oder zurück zu Enzym und Substrat zerfallen. Nach der Produktbildung und -abspaltung stellt das Enzym seine Ausgangsform wieder her. Die einzelnen Reaktionen werden dabei durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$  beschrieben.

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  des Enzyms kann vereinfacht mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden (siehe Formel 1.1).

$$v = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (1.1)$$

$K_M$  ist als die Substratkonzentration festgelegt, bei der die Hälfte der maximalen Geschwindigkeit erreicht wird (allgemein als Michaelis-Menten-Konstante bekannt). Sie

beschreibt außerdem die Stabilität von ES sowie die Affinität des Enzyms zum Substrat, wobei ein niedriger Wert eine hohe Substrataffinität und ein hoher eine geringe Affinität bedeuten.  $[S]$  steht in der Formel für die Substratkonzentration,  $v$  für die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms und  $v_{max}$  für die maximale Geschwindigkeit. Die Michaelis-Menten-Kinetik ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

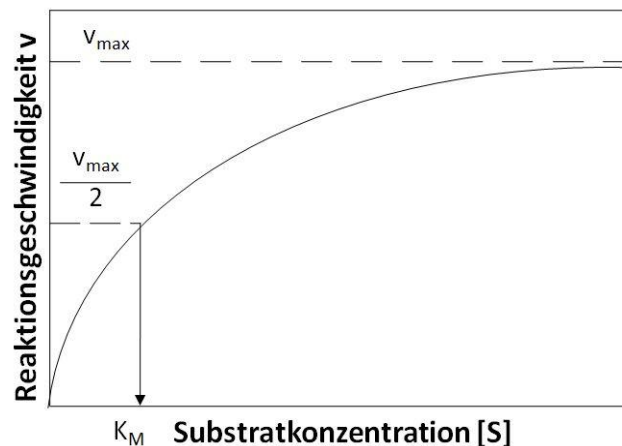


Abbildung 3: Michaelis-Menten-Kurve (modifiziert nach Bisswanger, 2008). Diese Abbildung gibt die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms in Abhängigkeit von der Substratkonzentration an. Bei steigender Substratkonzentration nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit zu, bis der maximale Wert ( $[S] \rightarrow \infty$ ) erreicht ist.  $K_M$  ist die Substratkonzentration, bei der  $v$  die Hälfte von  $v_{max}$  beträgt.

Neben der in Gleichung 1.1 und Abbildung 2 beschriebenen Reaktion gibt es auch wesentlich komplexere Kinetiken, die in der Natur häufiger vorkommen. Zum Beispiel können Inhibierungen auftreten, wobei Hemmstoffe (Inhibitoren) die Reaktion verhindern oder verlangsamen. Diese können beispielsweise als Substrat oder Produkt auftreten. Neben der Michaelis-Menten-Konstante gibt es für solche Reaktionen einen  $K_I$ -Wert, der das Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor angibt.

Die verschiedenen Möglichkeiten zur Inhibierung sind in der nachstehenden Abbildung 4 zusammengefasst.

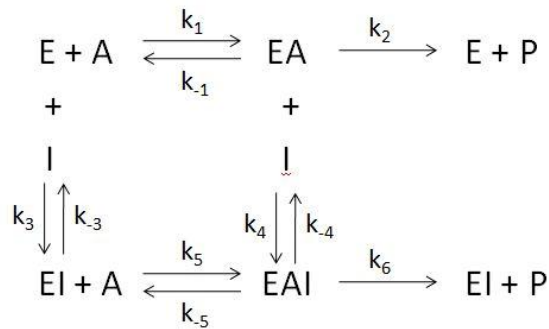


Abbildung 4: Schema der möglichen Inhibierungswege (in Anlehnung an Bisswanger, 2008). Aus dieser Übersicht lassen sich bestehende Inhibierungen ableiten. E steht hier für Enzym, A für Substrat, I für den Hemmstoff und P für Produkt.

Die bekanntesten Hemmungen, die aus dieser Abbildung entnommen werden können, sind die kompetitive, nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibierung (Ratengleichungen und Übersichten können der Tabelle A.1 aus Anhang A entnommen werden). Die kompetitive Hemmung ist durch die Bindung des Inhibitors an das freie Enzym gekennzeichnet. Dadurch stehen dem Substrat keine Bindungsstellen mehr zu Verfügung, woraufhin auch keine Produktabsplattung stattfinden kann. Dieser Effekt kann jedoch durch Substratüberschuss und der damit verbundenen Verdrängung des Hemmstoffes reduziert werden. Bindet ein Inhibitor an den entstandenen Enzym-Substrat-Komplex, wird von einer unkompetitiven Hemmung gesprochen. Das Enzym ist nicht mehr in der Lage, ein Produkt zu bilden und abzuspalten. Die nicht-kompetitive Inhibierung tritt auf, wenn der Hemmstoff an ein freies Enzym (siehe kompetitive Inhibierung) oder an den Enzym-Substrat-Komplex (wie bei der unkompetitiven Hemmung) bindet, wodurch eine Produktfreisetzung nicht mehr möglich ist [Bisswanger, 2008].

## 1.4 RNAi AGP3

Die RNAi, auch RNA-Interferenz, ist ein natürlicher Prozess zur Regulation von Genen in Zellen von Lebewesen. Sie dient dazu, fremde RNA (z.B. von Viren) abzuwehren und damit die Gene auszuschalten [Kurreck, 2007]. Das geschieht, indem die Zelle eine doppelsträngige RNA (dsRNA) bildet, die unter natürlichen Bedingungen in Zellen nicht vorkommt, es sei denn, sie wurde mit fremder RNA infiziert. Die dsRNA wird von bestimmten RNasen, den sogenannten Dicer, erkannt und in Fragmente mit einer Größe

von 21 bis 23 Nukleotiden gespalten (siRNA) [Schepers, 2004]. Daraufhin wird mithilfe weiterer Endonukleasen (möglicherweise ebenfalls die Dicer) und einem Strang der dsRNA ein RNAi-induced silencing complex (RISC) gebildet [URL-7]. Er besitzt die Fähigkeit, sich an den komplementären Abschnitt der messenger RNA (mRNA) anzulagern, wobei diese aufgespleißt wird. Aufgrund dessen wird die mRNA blockiert und anschließend abgebaut. Das hat zur Folge, dass auch die Expression der Gene und die damit verbundene Proteinbildung verhindert wird [Schepers, 2004].

Für die RNAi AGP3 wurde eine Interferenz in dem kodierenden Gen der kleinen Untereinheit der AGPase durchgeführt, welche sowohl aus zwei kleinen als auch zwei großen Untereinheiten aufgebaut ist. Die Interferenz erfolgte durch ein 550 Basenpaare (bp) langes Fragment, welches mittels RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) amplifiziert wurde. Die dafür verwendeten Primer lauten AGPF und AGPr1 und stammen von der mRNA des AGPS2-Gens aus *Pisum sativum* (X96765.1; Burgess *et al.* 1997) [Weigelt, 2010]. Daraus wurde ein Hairpin-Konstrukt hergestellt, welches durch *sense* und *antisense* Richtung des AGPase-Fragments zusammengeführt wurde. Dieses Konstrukt mit eingefügtem Intron (Gibberellin-20-Oxidase Gen von *Solanum tuberosum*) steht unter der Kontrolle des 2753 bp langen Legumin B4 Promotors aus *Vicia faba* und wurde zusammen mit dem Terminator der 3'-Region des Octosynthase-Gens in einen Binärvektor (PZP200) kloniert und anschließend in die Erbse (WT Eiffel) transformiert (siehe Anhang A: Abbildung A.1) [Weigelt, 2010]. Dadurch kann dieses Enzym in der Erbse nicht mehr funktionsfähig produziert werden. Infolge dessen entstehen auch erhebliche Veränderungen im Metabolismus der transgenen Erbse. Zum Beispiel wird durch die RNAi im AGPase-Gen die Stärkesynthese beeinträchtigt und im Vergleich zum Wildtyp bis zu 50 % weniger Stärke im Samen produziert. Das führt dazu, dass durch die aufgenommene Saccharose mehr Kohlenstoffgerüste bereitgestellt und in alternativen Produkten wie Proteinen angereichert werden, weshalb die transgene Erbse wesentlich höhere Proteingehalte als der Wildtyp zeigt [Weigelt *et al.*, 2009]. Des Weiteren kommt es zur Gewichtabnahme um maximal 20 %. Außerdem treten auch Veränderungen in der Akkumulation löslicher Zucker wie Saccharose auf, wodurch die Pflanze vermehrt Wasser aufnimmt. Aus diesem Grund verfügen RNAi AGP3 Samen auch über einen „wrinkled“ Phänotyp [Weigelt, 2010].

Weigelt (2010) konnte für die transgene Erbse drei Linien herstellen, die als iAGP1, iAGP2 und iAGP3 bezeichnet wurden. Letztere wies dabei die größten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf und wurde daher für diese Arbeit herangezogen.

## 1.5 Microarray

Microarrays werden genutzt, um Änderungen der Genexpression unterschiedlicher Materialien zu untersuchen. Eine häufig verwendete Methode ist die 2-Farben-cDNA-Technik (cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure) [Dondrup *et al.*, 2003]. Hierbei wird die RNA verschiedener Gewebe, Wachstumsphasen oder auch Genotypen eines Organismus isoliert und aufgereinigt. Anschließend werden durch reverse Transkription aus der RNA komplementäre DNS-Stücke (cDNA) erzeugt. Diese werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (je Probe eine Farbe) und gleichzeitig auf eine Glasplatte (Gen-Chip oder Microarray) hybridisiert [Nguyen & Williams, 2006]. Da der Gen-Chip sämtliche Gene in Form von einzelsträngiger DNS enthält, binden die cDNA-Stücke an die komplementäre DNA auf der Glasplatte. Für jeden Punkt (Spot) des Microarrays wird die Fluoreszenz detektiert. Je nach Stärke, Position und Farbe (rot, gelb oder grün) des Spots kann auf die Expressionsrate der Gene geschlossen werden. Gelb bedeutet dabei eine etwa gleiche Expressionsstärke, die beiden anderen Farben stehen für die jeweils stärkere Expression einer Probe (siehe Abbildung 5) [URL-8]. Bei diesen handelt es sich um wasserlösliche Cyaninfarbstoffe. Indocarbocyanin, auch als Cy3 bekannt, besitzt eine Absorption von 550 nm sowie eine Emission von 570 nm und erscheint somit grün. Indodicarbocyanin (Cy5) absorbiert bei 650 nm und emittiert bei 670 nm, sodass es als rote Farbe wahrgenommen wird [URL-9]. Die gemessenen Werte werden als Rohdaten in einer Tabelle festgehalten und mittels einer speziell für Microarrays entwickelten Software ausgewertet [Dondrup *et al.*, 2003]. Häufig werden die bearbeiteten Daten in Form eines MA-Plots dargestellt (Beispiel in Abbildung A.2 im Anhang A).

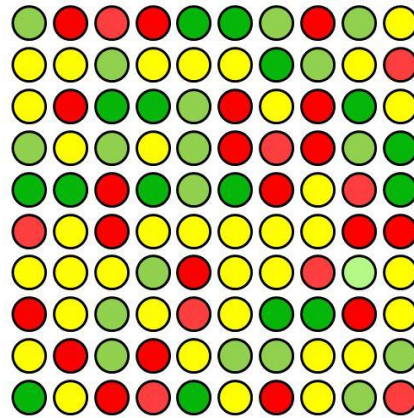


Abbildung 5: Schematisches Beispiel eines 2-Farben-cDNA-Microarrays. Diese Abbildung gibt einen Ausschnitt aus einem Microarray wieder. Viele markierte cDNA-Stücke zweier verschiedener Proben werden auf einem Array mit einsträngiger DNA gespottet. Rot bzw. Grün stellt die stärkere Genexpression einer Probe dar, deren Fluoreszenz photometrisch ermittelt wurde. Gelb steht hierbei für eine ungefähr gleiche Signalstärke beider Proben.

## 1.6 Expressed-Sequence-Tag (EST)

Das Genom verschiedener Organismen wird aus unterschiedlichen Gründen untersucht und sequenziert. Nicht nur Art und Zeitpunkt einer Genexpression spielt hierbei eine wichtige Rolle sondern auch der Vergleich der Gene im Normal- und verändertem Zustand. Dafür sind allerdings auch Typ und Aufgabe der exprimierten Proteine von großer Bedeutung. Um die Gene samt codiertem Protein herauszufinden, werden ESTs verwendet. Diese sind kleine Abschnitte der DNA-Sequenz mit einer Größe von 200 bis 500 Nukleotiden und dienen zur Identifizierung bestimmter Gene eines Genoms [URL-10]. Für die Produktion von ESTs ist die mRNA exprimierter Gene nötig. Diese stammt aus der Proteinbiosynthese, ein Prozess, der sich aus zwei Schritten zusammensetzt. Im ersten Schritt, der Transkription, wird die DNA-Doppelhelix aufgespalten und ein einzelner Strang in eine prä-mRNA übersetzt. Die nichtkodierenden Sequenzabschnitte, auch unter Introns bekannt, werden herausgespleißt, sodass die RNA nur noch aus den kodierenden Abschnitten, den Exons, aufgebaut ist und damit zur mRNA wird. Normalerweise folgt anschließend die Translation, wobei aus der mRNA Aminosäuren hergestellt werden, die wiederum zu komplexen Proteinen zusammengesetzt werden. Da die mRNA in der Zelle die exprimierten Gene widerspiegelt, ist sie in der Biotechnologie von großer Relevanz. Jedoch ist sie außerhalb der Zelle sehr instabil. Mithilfe der reversen Transkriptase kann

das Problem beseitigt werden, indem die mRNA in eine komplementäre DNA (cDNA) übertragen wird. Dieser Vorgang wird auch als reverse Transkription bezeichnet. Da die gebildete DNA noch einzelsträngig und mit der RNA verknüpft ist, wird die RNA durch Ribonukleasen abgebaut und der zweite Strang der DNA synthetisiert. Die entstandene cDNA unterscheidet sich vor allem durch das Fehlen von Introns von der normalen DNA. Sie wird anschließend durch Teilsequenzen, den ESTs, entweder vom 5'- oder 3'-Ende neu nachgebildet. Die jeweiligen ESTs lauten dann 5'- oder 3'-EST [Ulrich *et al.*, 2000]. Durch überlappende Teile, könnten sie zu größeren DNA-Stücken zusammengesetzt werden, wobei jedoch meist nicht das gesamte Gen erzeugt wird. Häufig werden die entstandenen EST-Sequenzen in sogenannten Bibliotheken gesammelt (zum Beispiel ViroBLAST), um durch sie zum Beispiel Ähnlichkeiten zwischen zwei Genen unterschiedlicher Organismen aufzudecken [URL-10].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

*Pisum sativum*: Embryos vom Wildtyp Eiffel und der RNAi AGP3  
Gewicht: 150 mg  $\pm$  20 mg

#### 2.1.2 Chemikalien

ATP Adenosin-5'-triphosphat  
Firma: Roche

ADP-Glucose Adenosindiphosphat-Glucose  
~ 95 %  
Firma: Sigma-Aldrich

Ammoniumheptamolybdat  $\geq 99$  %, p. a., krist.  
Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG

Benzamidin purum,  $\geq 95$  % (NT)  
Firma: Fluka (Sigma-Aldrich)

DTT 1,4-Dithiothreitol  
 $\geq 99$  %  
Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG

E-aminocaproidsäure Firma: Sigma-Aldrich

EDTA Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat  
 $\geq 99$  %, p. a., ACS (Titrierkomplex III)  
Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG



EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- Tetraessigsäure ≥ 99 % Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Eisen-(II)-Sulfat-Heptahydrat	ReagentPlus™, ≥ 99 % Firma: Sigma-Aldrich
Essigsäure	100 % Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol	> 99 % Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Fructose	D (-)-Fructose > 99,5 % für die Biochemie Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Fructose-6-Phosphat	D-Fructose-6-Phosphat-Dinatriumsalz-Hydrat 98 % Reinheit Firma: Sigma-Aldrich
Glucose	α-D (+)-Glucose Monohydrat Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Glucose-1-Phosphat	~ 95 % Firma: Sigma-Aldrich
Glucose-6-Phosphat	Firma: Roche
Glycerol	Rotipuran® ≥ 86 %, p. a. Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Hepes	Pufferan®, ≥ 95 %, p. a., f. d. Gewebebezucht Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Imidazol	≥ 99 % Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG

Isopropanol (2-Propanol)	Rotipuran® ≥ 99,8 %, p. a., ACS, ISO Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumhydroxid	≥ 85 % Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	≥ 98 %, Ph. Eur. Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid approx. 100 % Firma: Roche
NaPPi	Natriumpyrophosphat-Dekahydrat 99 %, ACS Reagent Firma: Sigma-Aldrich
Phosphorus Standard Lösung	0,65 mM Phosphorus Firma: Sigma-Aldrich
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid ≥ 99 %, für die Biochemie Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Saccharose	D (+)-Saccharose ≥ 99,5 %, p.a. Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Salzsäure	Rotipuran® ≥ 32 %, p. a., ISO Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Substrat 2	Firma: Klasmann-Deilmann
TCA	Trichloressigsäure ≥ 99 %, p. a., FIP > 110 KP 197°C Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Ultra Qualität Pufferan® ≥ 99,9 % Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	reinst Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG
UDP	Uridine-5'-diphosphat Natriumsalz 96 % Reinheit (HPLC) 1 % Lösungsmittel, 2,9 mol/mol Natrium, 2,3 mol/mol Wasser Firma: Sigma-Aldrich
UDP-Glucose	Uridine-5'-Diphosphoglucose Dinatriumsalz ≥ 98 % (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) Firma: Fluka (Sigma-Aldrich)

### 2.1.3 Enzyme und Puffer

Glc6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Organismus: <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1000 U/ml Firma: Roche
Hexokinase	Hefe-Überproduzent 1500 U/ml Firma: Roche
Invertase	Organismus: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 111 U/mg Firma: Fluka (Sigma-Aldrich)

Phosphoglucomutase	Präparierung des Kaninchenmuskels Suspension in 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 6 und 0,01 % EDTA 148 U/mg Protein, 56 mg Protein/ml (Biuret) Firma: Sigma-Aldrich
Phosphoglucose Isomerase	Organismus: Hefe 350 U/mg (25°C) Firma: Roche
UDP-Glucose Pyrophosphorylase	Organismus: Bäckerhefe, Typ X 100 U/1,06 g Firma: Sigma-Aldrich
Enzympuffer	50 mM Hepes-KOH (pH 7,4) 5 mM $\text{MgCl}_2$ 1 mM EDTA (pH 8) 1 mM EGTA (pH 7,3) 5 mM DTT 0,5 mM PMSF (100 mM PMSF in 100 % Isopropanol) 0,1 % Triton X-100 10 % Glycerol 2 mM Benzamindine 2 mM E-aminocaproidsäure

#### **2.1.4 Geräte**

Blockheizer	Modell: SBH200DI3 Firma: Stuart
Gelelektrophorese-Säulen	NAP™-10 Säulen, Sephadex™ 6-25 DNA Grade Firma: illustra™/GE Healthcare

Spektralphotometer	Modell: EL808 Software: Gen5 Firma: Biotek
Thermoschüttler	Modell: SC-20, PHMT Firma: Grant-bio
Zentrifuge	Modell: Centrifuge 5417R Firma: Eppendorf
Zentrifuge	Modell: Centrifuge 5810R Firma: Eppendorf

### 2.1.5 Datenbanken und interaktive Webprogramme

ArrayExpress	Datenbank funktioneller Genomexperimente einschließlich Genexpression URL: <a href="http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/">http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/</a>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool [Altschul <i>et al.</i> , 1990] URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
EMMA	Plattform für stetige Speicherung sowie automatischer und manueller Analyse von Microarray-Daten über Web-Interfaces [Dondrup <i>et al.</i> , 2003]
NCBI	National Center for Biotechnology Information URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
TargetP 1.1 Server	Tool zur Vorhersage der subzellulären Verteilung eukaryontischer Proteine [Emanuelsson <i>et al.</i> , 2007] URL: <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>

ViroBLAST	Voraussage von Sequenzähnlichkeiten, jedoch speziell für die virale Forschung entwickelt [Deng <i>et al.</i> , 2007] URL: < <a href="http://webblast.ipk-gatersleben.de/pea/">http://webblast.ipk-gatersleben.de/pea/</a> >
WoLF SPORT	Protein Subcellular Localization Prediction [Horton <i>et al.</i> , 2006] URL: < <a href="http://wolfpsort.org/">http://wolfpsort.org/</a> >

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anbau der Pflanzen

In folgenden Versuchen wurde Pflanzenmaterial aus Erbsenembryos vom Wildtyp Eiffel und RNAi AGP3 genutzt. Die Erbsenpflanzen wurden in vollständig regulierten Phytokammern mit einer Dunkelphase von 8 Stunden mit 16°C und einer Lichtphase von 16 Stunden und 18°C angezogen (Lichtintensität auf Höhe der Erde: 108  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Dabei betrug die relative Luftfeuchte stets 70 %. Der für das Wachstum erforderliche Boden wurde 1:1 aus Komposterde und Substrat 2 der Firma Klasmann-Deilmann, Geeste, zusammengesetzt.

### 2.2.2 Enzymextraktion

Für die Enzymextraktion wurden Erbsenembryos (WT Eiffel und RNAi AGP3) mit einem Gewicht von 150 mg  $\pm$  20 mg etwa 2-3 Stunden vor der Dunkelphase geerntet. Nach der Ernte wurden diese rasch in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Extraktion bei -80°C aufbewahrt. Für die Extraktion wurden die Embryos anschließend mit 1 ml Enzympuffer versetzt und gemörsert. Daraufhin wurden die Proben für 10 min bei 20200g und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurde 1 ml Überstand entnommen und bei 4°C mit Hilfe von NAP<sup>TM</sup>-10 Säulen aufgereinigt. Diese wurden vor ihrer Benutzung gründlich mit Enzympuffer gespült. Das gereinigte Extrakt wurde nun auf jeweils acht Aliquots verteilt und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.3 Enzym-Assays

Das Reaktionsvolumen der nachfolgend beschriebenen Assays betrug jeweils 300 µl. Um die Aktivität der Enzyme zu bestimmen, wurden für jeden einzelnen Assay zuerst die vermengten Pufferkomponenten vorgelegt. Daraufhin wurde das Enzymextrakt hinzugegeben und für fünf Minuten bei 25°C inkubiert. Zum Start der Reaktion wurden die Substrate dazupipettiert und die Extinktion über einen definierten Zeitraum gemessen. Die genauen Zeiten und Abläufe können den nachfolgend beschriebenen Assays entnommen werden, wobei für jede Extinktionsmessung 96-Well-Platten verwendet wurden.

#### AGPase-Assay

Nach Weber *et al.* (1995) enthält der AGPase-Assay des Wildtyps 50 mM Hepes (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM NAD<sup>+</sup>, je 2 Units Glc6PDH und PGM, 2,5 mM NaPPi und verschiedene Konzentrationen von ADP-Glucose von 0 bis 4 mM. Für die RNAi AGP3 wurden Substratkonzentrationen von 0-12 mM verwendet. Von den 300 µl Gesamtvolumen waren 10 µl Enzymextrakt enthalten. Vor Zugabe des Substrats ADP-Glucose wurde für fünf Minuten inkubiert, daraufhin mit Substratzugabe die Reaktion initiiert und die Reduktion von NAD<sup>+</sup> bei 340 nm in einem Microtiterplatten-Leser gemessen.

#### Hexokinase-Assay

Für den Assay der Glucose-spaltende Hexokinase wurden ähnlich wie bei McKibbin *et al.* (2006) 50 mM Hepes (pH 8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM ATP, 1 Unit Glc6PDH, 0,3 mM NADP<sup>+</sup> und unterschiedliche Konzentrationen der Glucose von 0 bis 1,5 mM vorgelegt. Zusätzlich bestand die Gesamtlösung aus 10 µl Extrakt. Nach einminütiger Inkubation und der Initiation mit Glucose wurde für 20 Minuten die Reduktion von NADP<sup>+</sup> bei 340 nm gemessen.

Statt dem Substrat Glucose wurde für die Fructose-phosphorylierende Aktivität der Hexokinase Fructose in den Konzentrationen von 0-0,5 mM verwendet und außerdem 1 Unit PGI zu dem Medium dazugegeben.

### Invertase-Assay

Die Aktivität der alkalischen Invertase wurde mit Hilfe eines Assays bestimmt, dass sich aus 20 mM Hepes (pH 5,7), 1,5 mM  $\text{NAD}^+$ , 1 mM ATP, 3,33 Units HK, 3,33 Units Glc6PDH zusammensetzt. Nach Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  Enzymextrakt wurde zum Start der Reaktion 0-600 mM Saccharose auf insgesamt 300  $\mu\text{l}$  hinzugefügt und bei 340 nm die Extinktion gemessen [in Anlehnung an Fotopoulos, 2005].

Für den Invertase-Assay wurde ein Glucose-Standard von 0-1 mM verwendet und eine Standardkurve zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit erstellt.

### Inorganische Pyrophosphatase-Assay

Nach dem Assay von Gross und ap Rees (1986) wurde für die anorganische Pyrophosphatase 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) sowie 5 mM  $\text{MgCl}_2$  vermengt (im Endvolumen) und anschließend 15  $\mu\text{l}$  Enzymextrakt hinzupipettiert. Danach wurde für fünf Minuten bei 25°C inkubiert. Zum Reaktionsstart wurde  $\text{NaPPi}$  in unterschiedlichen Konzentrationen von 0-1,5 mM beigemischt, sodass sich ein Volumen von 150  $\mu\text{l}$  ergab. Die Lösung wurde nun bei 25°C für 30 Minuten inkubiert und die Reaktion danach mit 150  $\mu\text{l}$  12 mM TCA gestoppt. Um die Wirkung von TCA zu verstärken, wurde das Well für zehn Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde bei 3220g zehn Minuten zentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand wurden je Well 150  $\mu\text{l}$  zusammen mit 150  $\mu\text{l}$  1 % Ammonium Molybdat + 5 %  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  + 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vermengt und darauf photometrisch bei 595 nm gemessen. Für die exakte Bestimmung der Phosphatkonzentration ohne Extinktionskoeffizienten wurde die Phosphorus Standard Lösung verwendet und eine Standardkurve von 0-0,065 mM Phosphorus Standard erstellt.

### Phosphoglucomutase-Assay

Die Bestimmung der Aktivität von PGM wurde durchgeführt, indem die Assaykomponenten (50 mM Hepes mit einem pH-Wert von 7,5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM  $\text{NAD}^+$  und 2 Units Glc6PDH) vermengt wurden. Von den 300  $\mu\text{l}$  Endvolumen (mit Pufferkomponenten und Substrat) sind insgesamt 2,5  $\mu\text{l}$  Enzymextrakt enthalten. Nach fünf Minuten Inkubation wurden 0-9 mM Glc1P hinzugegeben und anschließend bei 340 nm für 15 Minuten die Extinktionsänderung in einem Photometer gemessen [siehe Foster & Smith, 1993].



### Phosphoglucose-Isomerase-Assay

Die Aktivität von PGI wurde mit Hilfe des Assays, zusammengesetzt aus 100 mM Hepes (pH 7,5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,33 mM  $\text{NAD}^+$ , 1 Unit Glc6PDH und unterschiedlichen Konzentrationen von 0-3 mM Frc6P, bestimmt. Dieser Assay wurde nach den Assays von Foster & Smith (1993) sowie Schaffer & Petreikov (1997) modifiziert. Vor Substratzugabe wurden 2,5  $\mu\text{l}$  Extrakt hinzupipettiert. Zum Schluss wurde für 20 Minuten die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  bei 340 nm gemessen.

### Saccharose-Synthase-Assay

Die Grundlagen des Saccharose-Synthase-Assay stammen von Barrat *et al.* (2001). Hier wurden 50 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 Unit UGPase, jeweils 2 Units PGM, HK und Glc6PDH, 2,5 mM NaPPi und je 0,5 mM  $\text{NAD}^+$  und ATP vermischt. Anschließend wurden 5  $\mu\text{l}$  Enzymextrakt hinzugegeben. Da die Saccharose Synthase zwei Substrate zusammen umsetzt, wurde UDP mit 2 mM in übersättigter Form vorgelegt. Das zweite Substrat, die Saccharose, wurde in mehreren Konzentrationen von 0-200 mM dazupipettiert. Nach Extraktzugabe wurde bei 25°C für zwei Minuten inkubiert. Danach wurden beide Substrate auf ein Gesamtvolumen von 300  $\mu\text{l}$  zugesetzt und die Extinktionsänderung für 30 Minuten bei 340 nm gemessen.

### UGPase

In Anlehnung an Kleczkowski *et al.* (2005) ist der UGPase-Assay aus 50 mM Tris (pH 7,5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{NAD}^+$ , je zwei Units Glc6PDH und PGM zusammengesetzt. Außerdem wurden 5  $\mu\text{l}$  Extrakt ergänzt und nach fünfminütiger Inkubation 1,5 mM NaPPi und Konzentrationen von 0-1 mM UDP-Glucose hinzugefügt. Schließlich wurde die Extinktionsänderung bei 340 nm für 20 Minuten gemessen.

## **2.2.4 Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit**

Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  wurden die mit Hilfe des Photometers ermittelten Kurven (Extinktionsänderung pro Zeiteinheit) und die Formel 2.1 verwendet.

$$v = \frac{\Delta E}{\text{Extinktionskoeffizient} \cdot \text{Schichtdicke}} \cdot \frac{\text{Gesamt volumen}}{\text{Extraktvolumen}} \cdot VF \quad (2.1)$$

Für die Extinktionsänderung  $\Delta E$  pro Zeit wurde der Endwert minus dem Anfangswert der linearen Phase berechnet und der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  für  $\text{NAD}^+$  bei 340 nm eingesetzt. Der Verdünnungsfaktor ( $VF$ ) berechnet sich durch Formel 2.2.

$$VF = \frac{\text{Masse des Embryos} + \text{Volumen des Enzympuffers}}{\text{Masse des Embryos}} \quad (2.2)$$

Hierbei handelte es sich lediglich um eine Vereinfachung, wobei das Gewicht mit dem Volumen des Embryos gleichgesetzt wird, da die Erbse annähernd eine Dichte von 1 g/ml aufweist.

Für die Berechnung des Invertase-Assays gilt folgende Gleichung 2.3.

$$v = \frac{\Delta E}{\text{Geradenanstieg} \times \text{Extinktionskoeffizient} \cdot \text{Schichtdicke}} \cdot \frac{\text{Gesamt volumen}}{\text{Extraktvolumen}} \cdot VF \quad (2.3)$$

Die Ermittlung von  $v$  erfolgte im iPPase-Assay durch Formel 2.4.

$$v = \frac{\Delta E}{\text{Extinktionskoeffizient} \cdot \text{Schichtdicke}} \cdot \frac{\text{Gesamt volumen}}{\text{Extraktvolumen}} \cdot VF \quad (2.4)$$

Die Assayparameter für die Fructose-phosphorylierende Hexokinase-Aktivität wurden mithilfe von Gleichung 2.5 (unkompetitive Inhibierung) als nichtlineare Regression berechnet.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot [S]} \quad (2.5)$$

Dabei ist zu beachten, dass die Substratkonzentration  $[S]$  und die Inhibitorkonzentration  $[I]$  gleichzusetzen sind, da hierbei eine Substratinhibierung vorlag.

Generell wurde für alle Assays als nichtlineare Regression das Quasi-Newton-Verfahren verwendet. Es basiert auf dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate (zu einer Datenpunktwolke wird eine Kurve gesucht, die möglichst nahe an den Punkten verläuft),

wobei die Simulation mit Hilfe von Formel 1.1 bzw. 2.5 berechnet und so modifiziert wurde, dass sie sich so gut wie möglich an die gemessenen Werte angleicht. Mit Hilfe dieser Berechnung ist es möglich  $K_M$ ,  $K_I$  und  $v_{max}$  zu bestimmen.

Zur Untersuchung statistisch signifikanter Unterschiede der berechneten Parameter wird der t-Test benötigt. Dabei handelt es sich um einen Hypothesentest, mit dem Annahmen über einen Erwartungswert beurteilt werden können. Da es sich hier um eine zweiseitige Hypothese handelt, das heißt, zwei verschiedene Messgruppen werden analysiert (WT Eiffel und RNAi AGP3), wird von einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von 5 % ausgegangen [URL-11]. Die Prüfstatistiken der Versuchsdaten  $t_{Vers}$  werden mit Formel 2.6 berechnet, wobei  $n_1$  für den Stichprobenumfang vom Wildtyp und  $n_2$  für den der transgenen Erbse steht. Des Weiteren werden  $\bar{x}$  und  $\bar{y}$  als die jeweiligen arithmetischen Mittel und  $s_D$  als die gemeinsame Varianz beider Stichproben bezeichnet. Die Varianz  $s_D$  berechnet sich dabei aus Formel 2.7 [Köhler, Schachtel & Voleske, 2007].

$$t_{Vers} = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s_D} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (2.6)$$

$$s_D = \sqrt{\frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \left[ (\sum x^2) - \frac{(\sum x)^2}{n_1} + (\sum y^2) - \frac{(\sum y)^2}{n_2} \right]} \quad (2.7)$$

Der ermittelte  $t_{Vers}$ -Wert wurde darauf mit dem kritischen t-Wert ( $t_{krit}$ , der t-Tabelle zu entnehmen) verglichen. Ist  $t_{Vers}$  kleiner gleich  $t_{krit}$ , besteht keine signifikante Differenz. Wenn  $t_{Vers}$  größer als  $t_{krit}$  ist, dann wird von einem signifikanten Unterschied gesprochen [Köhler, Schachtel & Voleske, 2007].

### 2.2.5 Lokalisierung der Enzyme und ihrer Aktivitäten

Für die Lokalisierung der jeweiligen Enzyme und ihrer Isoformen wurden Expressionsdaten von Weigelt *et al.* (2009) verwendet, welche unter E-MEXP-1749 in ArrayExpress des EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute) veröffentlicht wurden. Die darin aufgeführten Oligonukleotid-Sequenzen von 70 bp Länge wurden gegen die in NCBI und ViroBLAST [Deng *et al.*, 2007] gespeicherten Daten [Franssen *et al.*, 2011] geblastet [Altschul *et al.*, 1990]. Die

gefundenen Sequenzen von *Pisum sativum* wurden anschließend in Tools wie TargetP 1.1 [Emanuelsson *et al.*, 2007] und WoLF PSORT [Horton *et al.*, 2006] eingesetzt, um die Präferenz der Enzyme zu bestimmten Kompartimenten der Zelle herauszufinden. Nebenbei wurde der M-Wert der bearbeiteten Microarray-Daten verwendet, um die Expression der Gene mit den tatsächlich gemessenen Enzymaktivitäten zu vergleichen. Zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung wurden die Signalstärken der Expressionsrohdaten verwendet. Da die Erntezeitpunkte der Assay-Proben im Mittel 21 DAF betrugen, wurde sich für Microarray-Proben (20-35 DAF) entschieden, deren Erntezeitpunkte so nah wie möglich an denen der Assay-Proben lagen. Somit wurden die Expressionsdaten der 20 DAF Proben verwendet. Die herausgefilterten Werte wurden mithilfe der Messwerte des ubiquitären RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase) standardisiert und anschließend wurde die prozentuale Verteilung auf die jeweiligen Isoformen ermittelt. Durch diese Prozentangaben konnte auf die Aktivität geschlossen werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 $v_{max}$ - und $K_M$ -Vergleich im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3

Aus der Tabelle 1 können die Mittelwerte, Standardabweichungen und -fehler der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten aller untersuchten Enzyme sowohl im Wildtyp als auch in der transgenen Erbse entnommen werden. In Tabelle 2 sind die dazugehörigen  $K_M$ -Werte der Enzyme dargestellt. Abbildung 6 gibt zusätzlich einen Überblick über die Aktivitätsverhältnisse in der Wildform und in der RNAi AGP3.

Tabelle 1: Zusammenfassung der maximalen Enzymgeschwindigkeiten im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3. Dargestellt sind die Mittelwerte der experimentell bestimmten maximalen Enzymaktivitäten im Wildtyp Eiffel und in der transgenen Erbse RNAi AGP3. Außerdem werden die Standardabweichung sowie Standardfehler gezeigt.

Enzym	WT Eiffel $v_{max}$ [nmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> FW]			RNAi AGP3 $v_{max}$ [nmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> FW]		
	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
AGPase	331,5	43,7	15,5	115,7	7,9	2,8
Hexokinase (Glc)	55,2	14,8	4,3	55,8	8,6	2,5
Hexokinase (Frc)*	548,3	77,9	22,5	534,6	67,1	19,4
Invertase (alk)	786	72	25,5	724,9	122,6	43,3
iPPase	2223,8	213,8	75,6	2143,9	188,3	66,6
PGI	2949,1	420,5	133	3087,7	324	102,4
PGM	8821,8	1517,1	536,4	9932	1615,5	571,2
SuSy	1160	270,9	95,8	1296,1	132	46,7
UGPase	12189	2355,7	785,2	11690	2322,2	774,1

\* bei einem  $K_I$ -Wert von 1,16 mM

Tabelle 2:  $K_M$ -Werte der untersuchten Enzyme im Wildtyp und der RNAi AGP3. Diese Tabelle zeigt die berechneten  $K_M$ -Mittelwerte, Standardabweichungen und -fehler der untersuchten Enzyme im WT Eiffel und in der RNAi AGP3.

Enzym	WT Eiffel $K_M$ [mM]			RNAi AGP3 $K_M$ [mM]		
	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
AGPase	0,23	0,097	0,034	1,31	0,435	0,154
Hexokinase (Glc)	0,037	0,02	0,006	0,035	0,009	0,003
Hexokinase (Frc)*	0,114	0,031	0,009	0,101	0,028	0,008
Invertase (alk)	32,2	5,54	1,96	35,3	9,25	3,27
iPPase	0,121	0,016	0,006	0,104	0,017	0,006
PGI	0,278	0,057	0,018	0,302	0,088	0,028
PGM	0,776	0,345	0,122	0,834	0,363	0,128
SuSy	33,2	7,92	2,8	30,2	5,07	1,79
UGPase	0,191	0,073	0,024	0,199	0,074	0,024

\* bei einem  $K_i$ -Wert von 1,16 mM

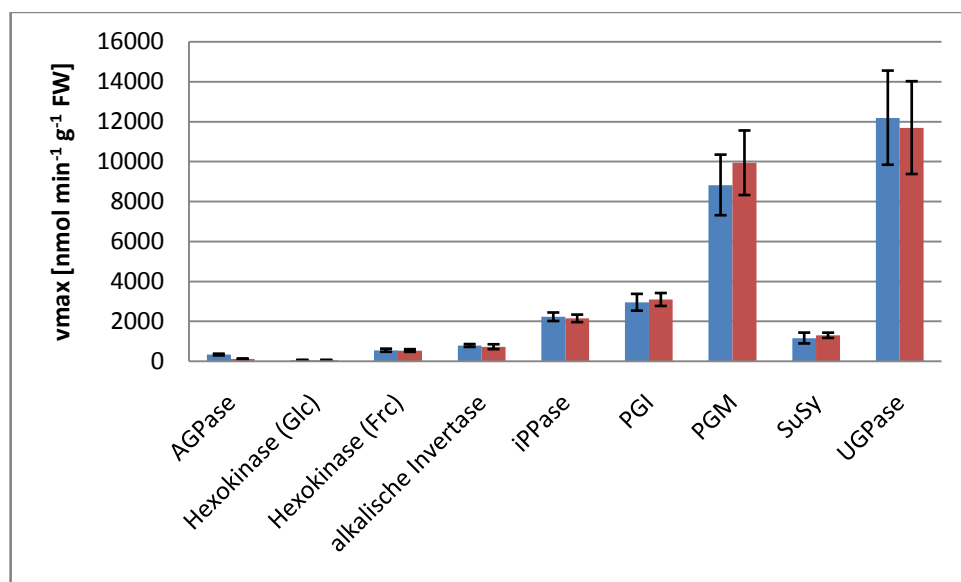


Abbildung 6: Verteilung der Gesamtaktivität auf die einzelnen Enzyme in der Wildform und in der transgenen Erbse. In dieser Abbildung werden Wildtyp (blau) und RNAi AGP3 (rot) jeweils mit Standardabweichung gegenübergestellt. Die größte Reaktionsgeschwindigkeit geht sowohl im Wildtyp als auch in der RNAi AGP3 von PGM und der UGPase aus. Die Glucose-phosphorylierende Aktivität der Hexokinase ist dagegen am geringsten.

Um die Signifikanz der  $K_M$ - und Aktivitätsunterschiede im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3 zu beurteilen, wurden die Prüfstatistiken der Versuchsdaten  $t_{Vers}$  und der kritische t-Wert  $t_{krit}$  in Tabelle B.1 und B.2 im Anhang B gegenübergestellt. Bis auf die AGPase zeigten alle Enzyme kleinere  $t_{Vers}$ - als  $t_{krit}$ -Werte. Zur Unterstützung der Beurteilung sind in beiden Tabellen die jeweiligen Irrtumswahrscheinlichkeiten dargestellt, die für ein signifikantes Ergebnis einen Wert unter 5 % annehmen müssen.

Die Aktivität der AGPase war im WT mit  $331,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  mehr als doppelt so groß wie die Aktivität in der RNAi AGP3 von rund  $115,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ . Zudem sind auch große Differenzen in den  $K_M$ -Werten zu sehen. Im Wildtyp wurde  $v_{max}/2$  bei  $0,23 \text{ mM}$  und in der RNAi AGP3 erst bei  $1,31 \text{ mM}$  erreicht. Durch Überprüfung mittels t-Test handelt es sich hier sowohl bei den  $K_M$ - als auch bei den  $v_{max}$ -Werten um statistisch signifikante Ergebnisse (siehe Tabelle B.1 und B.2 im Anhang B). Die Unterschiede beider Genotypen wurden als Michaelis-Menten-Kurven in Abbildung 7 veranschaulicht. Hier ist sichtbar, dass die Sättigung im Wildtyp bei geringer Konzentration von  $4 \text{ mM}$  ADP-Glucose erreicht wurde im Vergleich zur RNAi AGP3 mit etwa  $12 \text{ mM}$ .

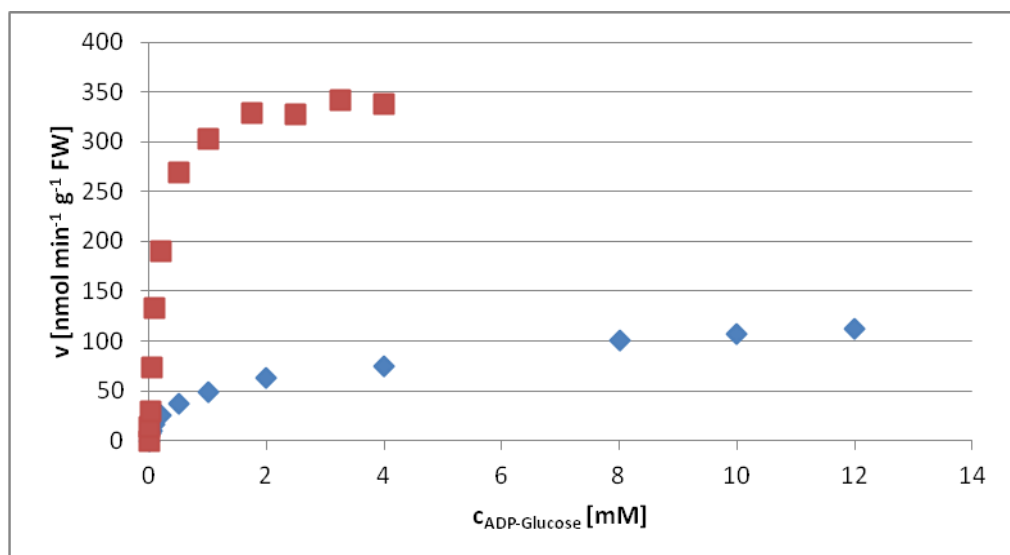


Abbildung 7: Vergleich der Aktivitätskurven der AGPase im WT und in der RNAi AGP3. Hier ist deutlich zu sehen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in der transgenen Erbse (blau) wesentlich geringer ist als im Wildtyp (rot). Nach etwa  $3 \text{ mM}$  ist eine Sättigung im Wildtyp zu verzeichnen. Die Erbse mit verändertem Genotyp zeigt die Sättigung erst bei ungefähr  $12 \text{ mM}$ .

Die Hexokinase verfügt über eine Glucose-phosphorylierende und über eine Fructose-phosphorylierende Aktivität. Im Vergleich zur Wildtyp hat sich  $K_M$  ähnlich der Reaktionsgeschwindigkeit bei dem Versuch mit Glucose kaum verändert ( $p > 5 \%$ , siehe Tabelle B.1 und B.2 im Anhang B). Für die Fructose-phosphorylierende Aktivität der Hexokinase kann höchstens von einem Trend zur Abnahme gesprochen werden. Zudem wurde nach mehrmaliger Messung eine Inhibierung festgestellt. Bei der Berechnung der Parameter wurden mehrere Typen getestet und sich für die Ratengleichung entschieden, bei der die Abweichung zwischen Simulation und Messwerten so gering wie möglich war. Daher wurde eine unkompetitive Inhibierung (siehe Tabelle A.1 im Anhang A) angenommen und ein  $K_I$ -Wert von 1,16 mM sowohl für den Wildtyp als auch die RNAi AGP3 ermittelt. Jedoch sollte beachtet werden, dass es sich hierbei um eine Substratinhibierung handelt, das heißt, die Konzentration des Inhibitors ist gleich der Konzentration des Substrates. Ein Beispiel für den Wildtypen ist unter Abbildung B.1 in Anhang B dargestellt. Mit Hilfe der Ratengleichung für die unkompetitive Inhibierung (siehe Formel 2.5) wurden auch  $K_M$ -Werte ermittelt, die ebenfalls einen Trend zu höheren Resultaten folgen. Für den  $v_{max}$  der alkalischen Invertase wurde ein höheres Ergebnis im WT als in der RNAi AGP3 ermittelt, welches eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 25 % besitzt und damit statistisch nicht signifikant ist. Bei den  $K_M$ -Werten betrug  $p$  über 40 %, wodurch hier keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen aber durchaus Tendenzen zu höheren  $K_M$ -Werten bestehen.

Die anorganische Pyrophosphatase verfügte in der RNAi AGP3 über einen knapp 100 nmol  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  FW niedrigeren  $v_{max}$ -Wert als im WT Eiffel, allerdings könnte es sich um ein zufälliges Ergebnis handeln ( $p > 5 \%$ ). Um dessen Signifikanz zu beurteilen, werden zusätzliche Tests benötigt. In der transgenen Erbse wurde außerdem ein kleinerer  $K_M$  als im Wildtyp gemessen. Die iPPase erreichte  $v_{max}/2$  im Wildtyp erst bei 0,121 mM und in der RNAi AGP3 bereits bei 0,104 mM. Hier wurde zwar keine Signifikanz auf dem 5 % Niveau gezeigt, doch kann hier von einem deutlichen Trend gesprochen werden (Anhang B: Tabelle B.2). Die  $v_{max}$ - sowie die  $K_M$ -Werte der Phosphoglucose Isomerase zeigen für beide Genotypen etwa die gleichen Resultate ( $p = 42 \%$ ), das heißt, es besteht keine Signifikanz. Das gleiche galt auch für den  $K_M$  der Phosphoglucomutase. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von PGM war in der transgenen Erbse dagegen tendenziell höher als im Wildtyp Eiffel, allerdings handelte es sich nicht um statistisch signifikante



Differenzen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für SuSy ermittelt. Die Aktivität erhöhte sich der Tendenz nach in der RNAi AGP3 im Vergleich zur Wildform, dagegen nahm der  $K_M$ -Wert ab ( $p > 5 \%$ ).

Generell besaß die UGPase zusammen mit PGM die größte gemessene Aktivität im Versuch. Sowohl im Wildtyp als auch in der transgenen Erbse wurde eine Aktivität von etwa  $12000 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  (siehe Tabelle 1). Das bedeutet, dass beide Ergebnisse, bestätigt durch die Irrtumswahrscheinlichkeit von  $66 \%$ , annähernd gleich sind. Der  $K_M$  verringerte sich im Vergleich zum Wildtyp in der RNAi AGP3. Mit  $p = 39 \%$  könnte aber höchstens von einem Trend zur  $K_M$ -Abnahme gesprochen werden.

### **3.2 Subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten**

#### **3.2.1 Verteilung der Aktivitäten auf die Enzymisoformen**

Die Tabelle 3 veranschaulicht die Verteilung der Gesamtaktivität aller Enzyme aus Tabelle 1 auf die einzelnen Isoformen. Zu der Berechnung wurden die Signalstärken (Signal Median von Wildtyp Eiffel und RNAi AGP3) der Rohdaten des Microarrays verwendet und ins Verhältnis gesetzt. Aus den prozentualen Verhältnissen der Signalstärken (Anhang B Tabelle B.3) und den gemessenen  $v_{max}$ -Werten wurden nun die Teilaktivitäten der Isoenzyme bestimmt.

In den Expressionsdaten wurden für die AGPase nur die Isoformen große Kette und AGPase 1 aufgeführt (siehe Tabelle 3). Letztere verfügte über eine etwa dreimal so hohe Aktivität mit  $221 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  im Wildtyp und  $73 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  in der transgenen Erbse im Vergleich zur großen Kette. Die große Kette besaß eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $111 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  im Wildtyp und  $43 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  in der RNAi AGP3. Trotz der ausführlichen Untersuchung der RNA-Interferenz der AGPase mittels Microarray durch Weigelt *et al.* (2009) konnte kein Eintrag in den Expressionsdaten gefunden werden.

Für die Hexokinase wurde die HK 6 notiert. Deren Reaktionsgeschwindigkeit bestand aus der Glucose- und Fructose-phosphorylierender Aktivität. Auch für die Invertase wurde nur eine Isoform im Assay aufgeführt. Sie hatte im Wildtyp eine höhere Aktivität als in der Erbse mit der RNA-Interferenz. Im Microarray konnten vier verschiedene Sequenzen für

die anorganische Pyrophosphatase gefunden werden. Diese sind die vakuoläre iPPase, die iPPase, die iPPase 1 und die vakuoläre iPPase 1. Die größte Aktivität im Wildtyp ging von letzterem Isoenzym und die geringste Aktivität von der vakuolären iPPase aus. In der transgenen Erbse verfügte ebenfalls die vakuoläre iPPase 1 über den größten ermittelten  $v_{max}$ -Wert, allerdings wurde nun die geringste Aktivität für die iPPase 1 ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die vakuoläre iPPase hat sich kaum verändert, wohingegen sich die Aktivität der iPPase verringert hat. Das heißt, für die beiden vakuolären Isoformen nahm die Aktivität in der RNAi AGP3 zu und für die beiden anderen eher ab. Für die Phosphoglucose Isomerase wurde nur eine Isoform im Microarray aufgelistet. Diese besaß im Wildtyp eine geringfügig kleinere Aktivität als in der Erbse mit verändertem Genotyp.

Im Erbsensamen wurden vier verschiedene Isoformen von PGM ermittelt: Ein cytosolisches Isoenzym und drei chloroplastische Formen. Die cytosolische Phosphoglucomutase zeigte eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit im WT Eiffel im Gegensatz zu der RNAi AGP3. In den Chloroplasten wurden dagegen viel höhere Aktivitäten der Phosphoglucomutase ermittelt (mit Ausnahme der letzten gelisteten Isoform). Eine Phosphoglucomutase besitzt in der Wildform eine Aktivität von  $3586 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ , zwei weitere eine von  $3612 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  und  $456 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ . Im transgenen Erbsenembryo war die Reaktionsgeschwindigkeit der cytosolischen PGM annähernd doppelt so groß. In den Chloroplasten erhöhte sich die Aktivität der ersten Isoform geringfügig, wohingegen die Aktivität der zweiten sich verringerte. Bei der Reaktionsgeschwindigkeit des dritten Isoenzyms wurden kaum Änderungen verzeichnet. Die UGPase-Aktivität besteht aus den Reaktionsgeschwindigkeiten der UGPase 2 und 5. Im WT Eiffel verhielten sich beide Isoenzyme ungefähr ähnlich. Allerdings vergrößerte sich die Differenz beider Enzymaktivitäten, sodass nun die UGPase 5 über deutlich höhere Aktivitäten verfügt.

Anhand der Expressionsdaten wurden drei verschiedene Isoenzyme für SuSy ermittelt. Außerdem wurden drei Einträge der Saccharose Synthase 1 im Microarray gefunden. Jede der Oligonukleotid-Sequenzen wurde an verschiedenen Stellen der Gesamtsequenz nachgewiesen. Im Wildtyp wurde für sie eine etwa gleiche Aktivität bis auf eine Ausnahme berechnet. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Aktivitäten in der RNAi

AGP3 jeweils um den Faktor 3 voneinander. Im WT Eiffel besaß SuSy 2 die größte maximale Reaktionsgeschwindigkeit, in der RNAi AGP3 war es SuSy 1 (zweiter Eintrag).

Tabelle 3: Maximale Reaktionsgeschwindigkeiten der untersuchten Isoenzyme im Wildtyp und im Embryo mit verändertem Genotyp

Name	Isoform	$v_{max}$ in [nmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> FW)	
		WT Eiffel	RNAi AGP3
AGPase	AGPase große Kette	111	43
	AGPase 1	221	73
Hexokinase	HK 6	604	590
Invertase	Inv	786	725
iPPase	vakuolär	264	280
	iPPase	723	526
	iPPase 1	282	228
	vakuoläre iPPase 1	955	1110
PGI	cytosolisch	2949	3088
PGM	cytosolisch	1168	2263
	chloroplastisch	3586	3114
	chloroplastisch	3612	3964
	chloroplastisch	456	591
SuSy	SuSy 1	243	337
	SuSy 3	103	41
	SuSy 2	421	123
	SuSy 1	296	634
	SuSy 1	97	160
UGPase	UGPase 2	6274	4688
	UGPase 5	5915	7002

### 3.2.2 Vorhersage der subzellulären Enzymverteilung

Mit Hilfe der Software-Tools TargetP und WoLF PSORT (siehe Tabelle B.4 und B.5 aus Anhang B), wurden die wahrscheinlichsten Kompartimente zusammengefasst und in Tabelle 4 dargestellt. TargetP wird hier nur als Bestätigung verwendet, da WoLF PSORT wesentlich detailliertere Angaben liefert. Nicht alle Enzyme wurden mit TargetP und WoLF PSORT untersucht, da einige bereits mittels Expressionsdaten zugeordnet wurden (zum Beispiel iPPase und PGM).

TargetP gab für die große Kette der AGPase eine Lokalisierung im sekretorischen Weg an. Das bedeutet, dass das Enzym nach TargetP zu Organellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum, den Vesikeln oder dem Golgi Apparat gehört. Dagegen zeigte WoLF PSORT eine Zuordnung zu den Plastiden. Nach TargetP ist ein Vorkommen der AGPase 1 in anderen Kompartimenten wie Cytosol wahrscheinlicher als in Chloroplasten. Tabelle B.4 im Anhang B zeigt eine Verteilung auf die Mitochondrien und teilweise Übereinstimmungen mit dem Nucleus. Die Hexokinase 6 konnte nach TargetP keinem bestimmten Kompartiment zugeordnet werden. Am wahrscheinlichsten sind jedoch Zellbestandteile wie Cytoplasma, Nucleus oder Zellmembran und -wand. Ähnliches galt auch für WoLF PSORT. Hier wurde die Hexokinase 6 zuerst dem Nucleus und an zweiter Stelle dem Mitochondrium zugeordnet. Für die Invertase wurde nur eine Sequenz im Microarray gefunden. Ihr Vorkommen wurde anderen Kompartimenten als den Mitochondrien oder Chloroplasten zugeteilt (TargetP), zum Beispiel den Nuclei oder Cytoplasma (siehe WoLF PSORT). Mithilfe von TargetP wurde eine Lokalisierung der iPPase in den sonstigen Kompartimenten festgestellt, nach WoLF PSORT ist allerdings die iPPase auf die Mitochondrien verteilt. Die iPPase 1 konnte laut TargetP zum sekretorischen Weg zugeordnet werden. Jedoch wurde dies nicht mithilfe von TargetP bestätigt. Die größte Wahrscheinlichkeit wurde hier für die Nuclei und die Mitochondrien berechnet. Für die Saccharose Synthase 1 konnten im Microarray drei Notationen verschiedener Sequenzen gefunden werden. Alle drei gehörten laut TargetP zu anderen Kompartimenten wie Nuclei oder Cytosol. Bei WoLF PSORT sind die letzten zwei SuSy 1 für Mitochondrien und Nuclei gleichgewichtet. Allerdings wies die erste Saccharose Synthase 1 eine eindeutigere Zuordnung zu den Mitochondrien auf. Die Lokalisierung von SuSy 2 konnte mittels WoLF PSORT den Mitochondrien bzw. den Nuclei und mit TargetP den Chloroplasten zugeteilt werden. SuSy 3 besaß den höchsten Wert bei Kompartimenten wie Cytosol, Nucleus usw. (siehe Tabelle B.5 im Anhang B), dagegen zeigte die Isoform unter WoLF PSORT eine größere Wahrscheinlichkeit für die Chloroplasten. Bei TargetP standen diese an zweiter Stelle (Anhang B: Tabelle B.5). Für die UGPase 2 konnte mittels TargetP eine Lokalisierung im sekretorischen Weg festgestellt werden. Dagegen gehörte sie laut WoLF PSORT zum Nucleus. Durch TargetP wurde eine Lokalisierung der UGPase 5 in anderen Kompartimenten wie Chloroplasten,

Mitochondrien und sekretorischem Weg ermittelt. Dazu zählen zum Beispiel die Nuclei, zu denen WoLF PSORT dieses Isoenzym zugeordnet hat.

Tabelle 4: Zusammenfassung der vermutlichen Enzym-Lokalisierung in der Zelle

Name	Isoform	WoLF PSORT	TargetP
AGPase	AGPase große Kette	Plastid	sekretorischer Weg
	AGPase 1	Mitochondrium	andere
Hexokinase	HK 6	Nucleus	andere
Invertase	Inv	Nucleus	andere
iPPase	iPPase	Mitochondrium	andere
	iPPase 1	Nucleus	sekretorischer Weg
SuSy	SuSy 1	Mitochondrium/Nucleus	andere
	SuSy 2	Mitochondrium/Nucleus	Chloroplast
	SuSy 3	Chloroplast	andere
UGPase	UGPase 2	Nucleus	sekretorischer Weg
	UGPase 5	Nucleus	andere

### 3.3 Zusammenhang von gemessener Aktivität und Expressionsstärke

Der M-Wert gibt das Rot/Grün-Intensitätsverhältnis von Wildtyp und RNAi AGP3 an. Er berechnet sich in erster Linie durch die Formel 3.1 unter Berücksichtigung weiterer Bedingungen, die in Dondrup *et al.* (2003) definiert sind.

$$M = \log \frac{Cy5}{Cy3} \quad (3.1)$$

Der M-Wert ist für jedes analysierte Enzym in der Tabelle 5 zusammengefasst. Ein positiver Wert bedeutet, dass Cy5 eine größere Signalstärke als Cy3 besitzt. Daraus folgt eine stärkere Expression in der transgenen Erbse als im Wildtyp. Hat Cy3 eine höhere Signalstärke, so entsteht ein negativer M-Wert. Geht der Wert gegen Null, lässt dies auf eine ähnliche Genexpression sowohl im Wildtyp als auch in der RNAi AGP3 schließen.

In Tabelle 5 ist daher sichtbar, dass die Expressionsstärke der AGPase, der Hexokinase und von PGI im Wildtyp wesentlich größer war. Aus Tabelle 1 ist eine etwa gleiche Aktivität der Hexokinase im Wildtyp wie auch in der transgenen Erbse ersichtlich. Die M-Werte für die iPPase entsprachen nur teilweise den Aktivitätsverhältnissen aus Tabelle 1.

Für die vakuoläre iPPase und die vakuoläre iPPase 1 war die Signalstärke in der RNAi AGP3 größer, als die gemessene Aktivität der iPPase vermuten lässt. Laut M-Wert nahm die Aktivität in der transgenen Erbse zu, die Reaktionsgeschwindigkeiten aus Tabelle 1 deuten aber auf das Gegenteil. Der negative M-Wert für PGI wies auf eine niedrigere Expression der RNAi AGP3 im Vergleich zum Wildtyp hin. Die Aktivität betrug dort jedoch geringfügig mehr. Bei PGM und SuSy war die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in der transgenen Erbse etwas höher. Ähnliches zeigte auch die Transkriptmenge von SuSy (eine Ausnahme ist jedoch SuSy 3). Für die Saccharose Synthase 1 wurde kein Mittelwert gebildet, allerdings konnte aufgrund der Signalstärke eine höhere Aktivität im transgenen Erbsensamen festgestellt werden, welche auch anhand der Tabelle 1 bestätigt wurde. Das Farbintensitätsverhältnis der Phosphoglucomutase wies jedoch mehr Abweichungen auf. Für die UGPase ist sichtbar, dass die Erbse mit verändertem Genotyp größere Signalstärken zeigte. Das Gleiche galt auch für die Aktivität des Enzyms.

Tabelle 5: Normalisierter M-Wert der untersuchten Enzyme in RNAi AGP3 und Wildtyp

Name	Isoform	normalisierter M-Wert
AGPase	AGPase große Kette	-0,346
	AGPase 1	-0,562
Hexokinase	HK 6	-0,556
Invertase	Inv	0,813
iPPase	vakuolär	0,463
	iPPase	-0,160
	iPPase 1	-0,055
	vakuoläre iPPase	0,516
PGI	cytosolisch	-0,296
PGM	cytosolisch	0,285
	chloroplastisch	-0,386
	chloroplastisch	-0,022
	chloroplastisch	0,574
SuSy	SuSy 1	2,462
	SuSy 3	-0,782
	SuSy 2	0,001
	SuSy 1	0,023
	SuSy 1	4,714
UGPase	UGPase 2	0,927
	UGPase 5	0,432

## 4 Diskussion

### 4.1 $v_{max}$ - und $K_M$ -Vergleich im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3

Ein Ziel dieser Arbeit war, die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der im Saccharoseabbau und in der Stärkesynthese teilnehmenden Enzyme sowohl im Wildtyp als auch in der transgenen Erbse zu bestimmen. Die ermittelten  $v_{max}$ -Werte wurden in Tabelle 1, die  $K_M$ -Werte in Tabelle 2 gegenübergestellt.

Der größte Unterschied zwischen den zwei Erbsenlinien lag sowohl in der AGPase-Aktivität als auch in der Affinität der AGPase zu ADP-Glucose. Durch die RNA-Interferenz wurde das Transkript der AGPase so verändert, dass weniger Enzym produziert und dadurch seine Aktivität reduziert wurde [Weigelt *et al.*, 2009]. Folglich hat sich auch die Affinität des Enzyms zum Substrat verändert (zu sehen am höheren  $K_M$ -Wert in der RNAi AGP3 im Vergleich zum Wildtyp). In Abbildung 7 wurden die Aktivitäten von WT Eiffel und der transgenen Erbse miteinander verglichen. Hier sind die Auswirkungen der RNA-Interferenz gut zu erkennen. Während spätestens bei etwa 3 mM ADP-Glucose die Sättigungsphase mit einem Wert von rund 330 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FW im Wildtyp erreicht wurde, war diese in der RNAi AGP3 erst bei circa 12 mM zu erkennen. Die Ergebnisse beider Genotypen konnten nur im Ansatz durch Untersuchungen anderer Erbsenlinien von Smith *et al.* (1989) und Craig *et al.* (1999) bestätigt werden. Deren Ergebnisse betrugen 1100 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FW [Craig *et al.*, 1999] und 1130 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FW [Smith *et al.*, 1989].

Da im Phänotyp des Erbsensamens Unterschiede zu sehen waren [Weigelt, 2010], lässt vermuten, dass sich durch die RNA-Interferenz nur der Metabolismus der Pflanze verändert hat. In der transgenen Pflanze lagerte sich durch die Reduktion der AGPase-Aktivität mehr Saccharose an [Weigelt *et al.*, 2009]. Die veränderten Metabolitkonzentrationen in der Erbse können auf andere Enzyme entweder aktivierend oder inhibierend wirken. Diese spielen auch in der Expression der Gene und bei der Entwicklung des Embryos eine Rolle [Weber *et al.*, 2005], indem die Transkriptmengen und damit die Aktivität der Enzyme reduziert oder verstärkt werden. In der Tabelle 1 ist zum Beispiel eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit von PGM in der RNAi AGP3 dargestellt. Im Wildtyp wurde eine Aktivität von circa 8820 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FW erreicht.

Dies ähnelt in etwa der Aktivität von  $21000 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ , die von Craig *et al.*, (1999) im Erbsenembryo gemessen wurde. Diese Veränderung ist wahrscheinlich durch erhöhte Saccharosekonzentration entstanden [Weigelt *et al.*, 2009]. Des Weiteren wurden Konzentrationen von Hexosen und Hexose-Phosphaten in der RNAi AGP3 wahrscheinlich durch einen Rückstau der Metabolite wegen der verminderten AGPase-Aktivität erhöht [Weigelt *et al.* 2009]. Möglicherweise könnte die verringerte Stärkekonzentration die Expression bestimmter biosynthetischer Enzyme aktivieren bzw. verstärken, um das Defizit auszugleichen. Beispiele sind die vermehrten Transkriptionen des Glc6P-Translokator oder der cytosolische Phosphoglucomutase in der transgenen Erbse [Weigelt *et al.*, 2009].

In Pflanzen gibt es verschiedene Hexokinasen: Hexokinasen, die sowohl Fructose als auch Glucose phosphorylieren, sowie Gluco- und Fructokinasen, die jeweils nur Glucose oder Fructose umwandeln. In diesem Versuch konnte die Glucose- und Fructose-phosphorylierende Aktivität der Hexokinasen gemessen werden. Erstere zeigte aber keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Erbsenlinien, dies wird auch anhand der Tabelle B.1 im Anhang B verstärkt. Die maximale Fructose-phosphorylierende Aktivität der Hexokinase war in der RNAi AGP3 hingegen etwas kleiner ( $p > 5 \%$ ). Allerdings wird davon ausgegangen, dass die Hexokinase den Großteil der Glucose umwandelt, da die Hexokinase generell eine höhere Affinität zur Glucose als zur Fructose besitzt [Turner & Copeland, 1981; Guglielminetti *et al.*, 2000]. Dies spiegelt sich auch in den niedrigen  $K_M$ -Werten von ca.  $0,04 \text{ mM}$  Glucose und  $0,11 \text{ mM}$  Fructose für beide Erbsenlinien wieder. Das bedeutet, dass die Hexokinase bei gleicher Konzentration mit Glucose eine höhere Geschwindigkeit erreicht als mit Fructose. Daher ist die Affinität zu Glucose höher, das eventuell an dem unterschiedlichen Aufbau der Hexosen lag (siehe Abbildung C.1 im Anhang C). Glucose kommt üblicherweise als Sechsring vor, wohingegen Fructose als Fünfring zu finden ist. Dass die Aktivität der Hexokinase ca.  $55 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  für die Glucose und über  $500 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  für die Fructose betrug (eine etwa neunmal höhere Aktivität als für die Glucose), kann vielleicht mit der schnelleren internen Umsetzung der Fructose begründet werden. Anhand des  $K_M$ -Wertes zeigten sich ebenfalls Auswirkungen. Die Affinität für Glucose und Fructose ist durch den veränderten Genotyp tendenziell etwas gesunken. Dies könnte aber auch mit Messschwankungen begründet werden. Für die Fructose wurde nach mehrmaliger Messung jedoch eine



Substratinhibierung festgestellt (Beispiel unter Anhang B, Abbildung B.1), da die Reaktion mit steigender Substratkonzentration zunehmend gehemmt wurde. Nach Testen verschiedener Berechnungsmöglichkeiten, wurde sich für die Ratengleichung entschieden (siehe Tabelle A.1 im Anhang A), mit der sich das Reaktionsverhalten der Fructose-phosphorylierenden Hexokinase am besten beschrieb. Daher wurde wie unter 3.1 beschrieben eine unkompetitive Inhibierung angenommen und ein  $K_I$ -Wert von 1,16 mM bestimmt, der die Ermittlung von  $v_{max}$  ermöglichte. Allerdings konnte nicht für jede Berechnung ein neuer  $K_I$  berechnet werden, weshalb es sich nur um eine vereinfachte Annahme handelte. Ohne  $K_I$  wäre der ermittelte  $v_{max}$  wesentlich geringer und würde demzufolge dem wirklichen Wert kaum entsprechen. Auch der  $K_M$ -Wert wäre ohne den  $K_I$  etwas kleiner. Die Enzymkinetik ist jedoch ohne Inhibierung für hohe Substratkonzentrationen stark fehlerbehaftet und würde zu falschen Rückschlüssen führen.

Die Affinität zum Substrat und die Aktivität zeigten auch bei der alkalischen Invertase geringe Unterschiede in den zwei Genotypen. Im WT Eiffel ist  $v_{max}$  mit  $786 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FW knapp  $60 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FW größer als im transgenen Typ (statistisch nicht signifikant). Allerdings war es nicht möglich, die Aktivität der sauren Invertase (das heißt, sie katalysiert bevorzugt im sauren Milieu) zu bestimmen, da die Reaktionsgeschwindigkeit sehr gering war. Ihre Existenz konnte jedoch in Blättern nachgewiesen werden [Kingston-Smith *et al.*, 1989], sodass ein Vorkommen in Erbsenembryos nicht ausgeschlossen ist. Die Affinität der Invertase hat durch die RNA-Interferenz in der Erbse der Tendenz nach zugenommen, das heißt, die Invertase baut die Saccharose in der RNAi AGP3 schon bei geringeren Konzentrationen verstärkt ab.

Die iPPase und UGPase wiesen auf ähnliche Auswirkungen in den Genotypen wie im Invertase-Assay hin. Hier könnte sich die transgene Erbse auf die veränderte Aktivität der AGPase eingestellt haben, indem die Reaktionsgeschwindigkeiten der drei anderen Enzyme heruntergesetzt wurden. Für die UGPase wurden vergleichbare Aktivitäten von  $12 \pm 0,5 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FW durch Smith *et al.* (1989) belegt. Diese  $K_M$ -Werte zeigten außerdem keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Affinität zum Substrat. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der iPPase lagen allerdings nur annähernd in dem Bereich der Messwerte von Craig *et al.* (1999) mit rund  $3900 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FW. Dies lässt sich wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Genotypen und vielleicht den

verschiedenen äußeren Einflüssen wie Temperatur, Entwicklungsstadien oder Erntezeitpunkte der Erbsenembryos begründen. Der  $K_M$  der iPPase deutet aber auf einen Trend zur Zunahme der Substrataffinität hin.

Für PGI, PGM und SuSy wurde die Aktivität als Antwort auf die Veränderung vermutlich erhöht. PGI wies zusammen mit der Phosphoglucomutase im Wildtyp eine ähnliche Aktivität auf, wie sie in Plasmiden bestimmt wurde [Foster & Smith, 1992]. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der Saccharose Synthase im Wildtyp Eiffel waren den Resultaten mit etwa  $2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$  von Craig *et al.* (1999) recht ähnlich.

Durch die Antwort auf die RNA-Interferenz ist es der Erbse nicht möglich, ähnliche Mengen an Stärke zu produzieren. Daher verringerte sich der Stärkegehalt im Vergleich zum Wildtyp um bis zu 50 % [Weigelt *et al.*, 2009]. Die Substrataffinität könnte durch die genetische Veränderung sowohl bei PGI als auch bei PGM tendenziell abgenommen haben, im Gegensatz dazu vergrößerte sie sich bei den Saccharose Synthasen.

Da fast alle Enzyme außer der ADP-Glucose Pyrophosphorylase höhere  $t_{krit}$ -Werte aufwiesen (siehe Tabelle B.1), sind die Unterschiede in den Ergebnissen statistisch nicht signifikant ( $p > 5 \%$ ). In der RNAi AGP3 ist lediglich ein Trend für eine höhere bzw. niedrigere Aktivität der Enzyme zu erkennen. Für die AGPase ist deutlich zu sehen, dass sie als einzige über signifikante Differenzen im Wildtyp Eiffel und in der RNAi AGP3 verfügte.

## **4.2 Subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten**

### **4.2.1 Verteilung der Aktivitäten auf die Enzymisoformen**

Mittels Microarray konnten nur die in Tabelle 3 gelisteten Enzymisoformen im Erbsensamen gefunden werden.

Beispielsweise setzt sich die AGPase-Aktivität zu etwa einem Drittel aus der Aktivität der AGPase große Kette und zu zwei Dritteln aus der Aktivität der AGPase 1 zusammen. Für die Hexokinase wurde nur die HK 6 ermittelt, daher könnten noch mindestens fünf weitere Isoformen in der Erbse vorhanden sein. In der Tabakpflanze wurden dagegen zehn verschiedene Hexokinase-Gene nachgewiesen [Giese, 2005]. Falls sie auch für die

Erbse existieren, könnten diese allerdings auch in anderen Organen, wie Wurzeln, Blätter oder Blüten auftreten.

Für die Invertase wurde in den Expressionsdaten nur eine Oligonukleotid-Sequenz aufgeführt. Das kann bedeuten, dass im Erbsenembryo entweder keine weiteren Isoformen existieren oder die anderen Invertasen ähnlich der Hexokinase in anderen Geweben lokalisiert sind. Für die iPPase wurden vier verschiedene Sequenzen im Microarray gelistet, die mit vakuolärer iPPase, vakuolärer iPPase 1 sowie iPPase und iPPase 1 benannt waren. Bei der vakuolären iPPase und der iPPase handelt es sich nicht um das gleiche Enzym, da Unterschiede in den Sequenzen existieren. Ähnliches ist auch für die vakuoläre iPPase 1 und iPPase 1 möglich.

Für die Phosphoglucose Isomerase wurde nur eine Sequenz bestimmt, der die gesamte Aktivität zugeschrieben wurde. Falls es noch andere PGI gibt, könnten diese z.B. in Blättern, Stamm oder Wurzeln vorkommen. Für PGM wurden vier verschiedene Isoformen gefunden: Eine cytosolische und drei in Chloroplasten vorhandene Isoenzyme. Die Sequenz der ersten Chloroplasten-Isoform ist mit 613 bp verhältnismäßig kurz. Sie könnte eventuell gemeinsam mit der dritten gefundenen Sequenz ein Isoenzym kodieren (Länge: 1252 bp), da beide aufgrund ihrer Länge vermutlich unvollständig sind und Überschneidungen nicht existieren. Es wäre aber auch möglich, dass beide Sequenzen unterschiedliche Isoformen kodieren. Das zweite Isoenzym besitzt knapp 2200 bp, daher ist sie wahrscheinlich vollständig. Bei dieser Sequenzlänge ist es eher unwahrscheinlich, dass sie zusammen mit den anderen Chloroplastenisoform-Sequenzen ein Isoenzym bilden. Für die dritte Isoform wurde mithilfe der Signalstärken eine geringere Aktivität berechnet (siehe Tabelle 3). Diese könnte daher nicht vorrangig am Saccharoseabbau beteiligt sein. Die Aktivität der cytosolischen Phosphoglucomutase war in der transgenen Erbse wesentlich stärker. Die RNA-Interferenz hat eventuell auch hier Einfluss auf das metabolische Netzwerk.

Da für die drei Saccharose Synthasen [Barrat *et al.*, 2001], speziell für SuSy 1, mehrere Sequenzen vorhanden waren und damit auch mehrere Ergebnisse erzielt wurden, können keine genauen Aussagen über ihre Aktivitätsverteilung auf die Isoenzyme getroffen werden. Man könnte den Wert für SuSy 1 mitteln, jedoch würde dies die Angaben verfälschen, da die mittels Signalstärke berechneten Aktivitäten sehr weit auseinanderlagen. Der  $v_{max}$ -Wert im Wildtyp wäre somit bei  $212 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  und

in der RNAi AGP3 bei  $377 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ . Allgemein war aber die Gesamtaktivität von SuSy in der transgenen Erbse mit knapp  $1300 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  größer als im Wildtyp mit  $1160 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ . Dagegen wurde  $v_{\max}$  von SuSy 2 und 3 reduziert. Dies lag entweder an der Stoffwechselumstellung der Pflanze oder den schwankenden Expressionsstärken und der damit verbundenen Berechnung der  $v_{\max}$ -Werte.

Im Erbsensamen konnte nur die zweite und fünfte Isoform der UGPase gefunden werden. Weitere Isoenzyme existieren wie bei den übrigen Enzymen offenbar in anderen Organen. Die UGPase 2 besaß eine etwas höhere Reaktionsgeschwindigkeit im Wildtyp als die UGPase 5. In der RNAi AGP3 trat genau der umgekehrte Fall auf. Im Wildtyp ist der Unterschied dagegen deutlich geringer als der zwischen den zwei Isoformen der transgenen Erbse. Ein Grund dafür könnten Messfehler aber auch die Anpassung der Pflanze auf die veränderten Metabolitkonzentrationen sein.

#### **4.2.2 Vorhersage der subzellulären Enzymverteilung**

Die Bestimmung der subzellulären Verteilung mittels WoLF PSORT und TargetP ist sehr unterschiedlich ausgefallen. Da die Sequenzen nicht vollständig waren, konnten sie nicht eindeutig den Kompartimenten zugeordnet werden. Sowohl TargetP als auch WoLF PSORT lieferten keine zuverlässigen Ergebnisse. Gerade für TargetP könnten mögliche Gründe in der Unvollständigkeit der Sequenzen liegen, da dieses Tool mit einem Algorithmus arbeitet, der speziell den N-Terminus der Sequenzen untersucht. Hier sind die Kodierung für die Signalpeptide und der voraussichtliche Weg zum Bestimmungsort hinterlegt. Die meisten Sequenzen wurden auf Grundlage einer cDNA- Bibliothek und von Expressed-Sequence-Tags (ESTs) erstellt. ESTs sind kurze DNA-Sequenzen einer cDNA, die entweder vom 5'- oder vom 3'-Ende sequenziert wurden. Zur Erstellung der Erbsensequenz-Datenbank wurde am 3'-Ende eine cDNA mit der Sequenzierung begonnen [Radchuk, 2005]. Die entstandenen Sequenzabschnitte können bei Überschneidungen zu größeren Sequenzen zusammengesetzt werden. Aufgrund derzeit begrenzter Technologien war es nicht möglich, längere ESTs herzustellen und damit vollständige Enzymsequenzen zu erhalten. Neben zahlreichen Lücken hat dies zur Folge, dass vor allem das 5'-Ende eines Gens und damit der N-Terminus im Protein fehlt.

Nicht nur bei TargetP gab es Probleme sondern auch bei WoLF PSORT. In Tabelle 4 sind ausschließlich unpräzise Ergebnisse zu erkennen. Bei insgesamt 14 Nachbarsequenzen (Erläuterung dazu siehe Tabelle B.4 im Anhang B) konnten maximal sieben Zuordnungen für ein Kompartiment ermittelt werden, bei der die zu untersuchende Sequenz eine geringe Übereinstimmung mit den gefundenen Nachbarn aufzeigte (Beispiel für die AGPase 1 siehe Abbildung C.2 im Anhang C).

Laut Weigelt *et al.* (2009) ist die AGPase in Plastiden lokalisiert (speziell Chloroplasten und Amyloplasten), jedoch konnte aufgrund der unvollständigen Sequenzen nur mittels WoLF PSORT die große Kette der AGPase den Plastiden zugeordnet werden. Die zu geringe Datenlage könnte wahrscheinlich zu einer Fehleinschätzung des Programms geführt haben. Mithilfe beider Lokalisierungstools wurde für die Hexokinase 6 ein ähnliches Ergebnis berechnet. Da zu den anderen Kompartimenten von TargetP auch der Nukleus zählt, ist nicht ausgeschlossen, dass die Hexokinase auch wirklich dort vorkommt. Allerdings gibt es mehrere Literaturverweise, in denen aufgeführt ist, dass Hexokinase-Aktivitäten in Chloroplasten bzw. Plastiden und Mitochondrien nachgewiesen wurden [Claeyssen & Rivoal, 2007; Cosio & Bustamante, 1984]. Daher wurde mit den Tools vermutlich die falsche Lokalisierung bestimmt. Für die Invertase existieren in höheren Pflanzen drei verschiedene Isoformen: Isoenzyme in Apoplasten bzw. der Zellwand, in der Vakuole und im Cytosol [Fotopoulos, 2005]. Die Zellwand- und die vakuoläre Invertase sind allerdings Enzyme, die im sauren Milieu katalysieren. Diese haben jedoch für die Aktivitätsmessungen eine untergeordnete Bedeutung, da nur die Reaktionsgeschwindigkeit der alkalischen Invertase berechnet wurde. In Tabelle 4 ist zu sehen, dass die alkalische Invertase durch beide Tools den falschen Organellen zugeordnet wurde.

Zwei der anorganischen Pyrophosphatasen konnten durch die Expressionsdaten von Weigelt *et al.* (2009) der Vakuole zugewiesen werden. Außerdem gab es auch weitere Anzeichen, dass die alkalische iPPase in der Vakuole lokalisiert ist [Gross & ap Rees, 1986]. Die subzelluläre Verteilung der anderen zwei Phosphatasen konnte nach WoLF PSORT nicht eindeutig bestimmt werden. Für die iPPase wurden Mitochondrien und weitere Kompartimente (z. B. Nucleus, Cytoplasma, Vakuole), für die iPPase 1 der Nucleus und der sekretorische Stoffwechselweg ermittelt. Laut Vianello *et al.* (1991) existieren auch Pyrophosphatasen in den Mitochondrien des Erbsenstängels. Das heißt, die anderen zwei

Enzyme, deren Zuordnung nicht genau durch beide Tools definiert wurde, könnten eventuell auch in den Mitochondrien des Erbsensamens vorkommen.

Für die Phosphoglucomutase wurden 4 verschiedene Sequenzen mit entsprechender subzellulärer Verteilung gefunden: Eine cytosolische und drei chloroplastische Phosphoglucomutasen [Weigelt *et al.*, 2009]. Es ist jedoch nicht ganz klar, ob es sich bei den drei chloroplastischen um ein und dieselbe Isoform oder um drei verschiedene handelt. Für die Kartoffel wurden die größten Aktivitäten in Amyloplasten gemessen, außerdem konnte auch eine Aktivität im Cytoplasma und in der Vakuole bestimmt werden [Farré, 2001]. Das bedeutet, dass auch für die Erbse vakuoläre Phosphoglucomutasen existieren könnten. Diese sind entweder nicht im Microarray aufgeführt oder in anderen Organen der Erbse präsent.

Im Microarray wurde nur eine Phosphoglucose Isomerase gefunden, die dem Cytosol zugewiesen werden konnte. Allerdings wurde bei anderen Untersuchungen des Erbsenembryos eine Aktivität von PGI in Plastiden identifiziert [Foster & Smith, 1992]. Daher müssten mindestens zwei verschiedene Isoformen der Phosphoglucose Isomerase vorhanden sein.

In der Erbse wurden drei verschiedene Isoenzyme der Saccharose Synthase nachgewiesen: SuSy 1 (NCBI: AJ012080), SuSy 2 (NCBI: AJ001071) und SuSy 3 (NCBI: AJ311496) [Barrat *et al.*, 2001]. Diese konnten auch eindeutig den gelisteten Oligonukleotid-Sequenzen der Expressionsdaten zugeordnet werden. Für SuSy 1 gab es in den Expressionsdaten allerdings drei verschiedene Sequenzen. Für alle drei wurde die subzelluläre Verteilung kalkuliert. Mittels WoLF PSORT wurden Nuclei und Mitochondrien und mit TargetP andere Kompartimente bestimmt. Es könnte also möglich sein, dass SuSy 1 in den Nuclei existiert. SuSy 2 konnte aufgrund des wahrscheinlich fehlenden N-Terminus nicht einem einzigen Kompartiment zugeteilt werden. Das gleiche galt auch für die Saccharose Synthase 3. Bei weiteren Untersuchungen des Erbsenembryos wurde eine Aktivität von SuSy im Cytosol festgestellt, besonders der Saccharose Synthase 1 [Weigelt *et al.*, 2009]. Dies wurde auch durch Farré (2001) bestätigt. Jedoch lassen andere verfügbare Sequenzen vermuten, dass es sogar eine vierte Saccharose Synthase gibt [Franssen *et al.*, 2011]. Diese könnte eventuell im Cytoplasma lokalisiert sein.

Die UGPasen gehören laut WoLF PSORT zu den Nuclei. Nach TargetP wurde eine Lokalisierung der UGPase 2 im sekretorischen Stoffwechselweg und der UGPase 5 in

Kompartimenten wie der Vakuole oder den Nuclei bestimmt. Für das letztere Isoenzym lieferten beide Programme ähnliche Ergebnisse. Sie konnten die UGPase 2 jedoch keinem Organell eindeutig zuweisen. Allerdings wurde bei weiteren Messungen belegt, dass UGPasen, nicht aber der genaue Isotyp, im Cytoplasma auftritt [Weigelt *et al.*, 2009]. Daher wäre es durchaus möglich, dass die UGPase 5 im Cytoplasma und die UGPase 2 in den Nuclei lokalisiert ist.

#### **4.3 Zusammenhang von gemessener Aktivität und Expressionsstärke**

Ein Ziel war, die Expressionsstärke und ihre Korrelation mit der tatsächlich vorhandenen Aktivität im WT Eiffel und in der RNAi AGP3 zu untersuchen. Dazu sollten die Tabellen 1 und 5 gegenübergestellt werden.

Bei Betrachtung der AGPase trifft die Vermutung zu, dass Aktivität und Expressionsstärke miteinander korrelieren. Da der M-Wert negativ ist, deutet dies auf eine geringere Genexpression und daraus resultierend eventuell auf eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit in der transgenen Pflanze hin. Dies stimmt auch mit dem berechneten Wert für  $v_{max}$  überein. Allerdings zeigen sowohl Expressionsstärke- als auch Aktivitätsänderungen ähnliche Reduzierungen auf. Die veränderte AGPase-Expression in der RNAi AGP3 Pflanze führt zu einer verringerten ADP-Glucose-Konzentrationen, welche wahrscheinlich ausgleichende Stoffwechselwege initiiert, wie zum Beispiel die Stärkephosphatase [Weigelt *et al.*, 2009]. Die Geschwindigkeit der Hexokinase verhielt sich in beiden Genotypen annähernd gleich. Nur die Fructose-phosphorylierende Aktivität nahm in der transgenen Pflanze leicht ab, jedoch sind diese Unterschiede sehr klein. Der M-Wert deutete ebenfalls auf eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit der Hexokinase hin. Allerdings lässt der Wert bei einem Zusammenhang von Genexpression und Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms vermuten, dass die Differenz der Aktivitäten größer wäre. Gezeigt wird aber, dass die Umsatzrate der Invertase herunter reguliert wurde, um die Konzentration freier Hexosen so gering wie möglich zu halten [Weigelt *et al.*, 2009]. Der M-Wert der Invertase wies im Vergleich zu  $v_{max}$  auf eine Überregulation der Expression in der RNAi AGP3 hin. Die Resultate der iPPase, PGM, SuSy und UGPase legten dagegen eine Überregulation der Enzyme im Embryo mit verändertem Genotyp dar. Dies traf nur teilweise auf die gemessenen Aktivitäten zu. Die iPPase-Aktivität war im

transgenen Erbsensamen kaum geringer als im Wildtyp, daher kann eventuell von einer gleichbleibenden Aktivität gesprochen werden. Ähnliches galt auch für PGM. Für SuSy stimmten Expression und Aktivität außer bei der Saccharose Synthase 3 überein. Sie kennzeichnete sich durch eine hochregulierte Expression aus (siehe unter E-MEXP-1749 in ArrayExpress des EMBL-EBI).

Die M-Werte der UGPase sowie von PGM zeigten keine Gemeinsamkeiten mit den ermittelten Aktivitäten. Laut M-Wert müsste auch die Aktivität der UGPase geringer und von PGI im Wildtyp größer sein. Jedoch traf für beide Enzyme diese Vermutung nicht zu, die auf der Annahme basiert, dass es einen qualitativen Zusammenhang zwischen Expression und Aktivität gibt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten von PGI wiesen beispielsweise kaum Differenzen auf. Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Expression der Gene und die Enzymaktivität nicht zwangsweise korrelieren. Anhand der Expressionsstärke kann auch keine Aussage über die Proteinmenge getroffen werden, da sich während der Samenentwicklung die Transkriptionsebenen extrem verändern [Hajduch *et al.*, 2010]. Für eine Aussage über die absolute Proteinmenge müsste zusätzlich die Proteindegradation berücksichtigt werden, die jedoch nur schwer ermittelt werden kann.

#### **4.4 Fazit**

Die zusammengefassten Resultate lassen vermuten, dass die Hauptaktivitäten beider AGPasen, welche meistens als plastidäre Marker verwendet werden, in den Plastiden lokalisiert sind. Falls dennoch eine cytosolische Aktivität gemessen wird, handelt es sich lediglich um eine unspezifische UGPase-Aktivität. Die Hexokinase 6 könnte in den Nuclei vorkommen. Um dies zu untersuchen, wären weitere Versuche nötig. Außerdem wurde bewiesen, dass in höheren Pflanzen Hexokinasen in Plastiden und Mitochondrien existieren [Claeyssen & Rivoal, 2007]. Dies wurde auch durch Untersuchungen von Erbsenblättern bestätigt [Cosio & Bustamante, 1984]. In Erbsensamen konnten bisher zwei Hexo- und zwei Fructokinasen gefunden werden [Copeland *et al.*, 1984]. Daher ist unklar, ob tatsächlich nur zwei, sechs oder auch mehr Hexokinasen im Embryo vorhanden sind. Falls es nur zwei gibt, könnte jeweils eine in den Chloroplasten und die andere in den Mitochondrien lokalisiert sein. Ob der Erbsensamen nur eine der beiden Formen



enthält kann abschließend nicht geklärt werden. iPPasen existieren dagegen in Vakuolen und Mitochondrien. Je zwei Isoenzyme könnten eventuell jeweils einem Organell zugewiesen sein. Im Wildtyp wäre dann auch die Aktivität zu etwa gleichen Teilen auf beide Kompartimente verteilt, allerdings könnte in der Vakuole der transgenen Erbse eine größere Enzymaktivität als in den Mitochondrien vorherrschen. Im Gegensatz dazu, war es bei PGM zweifelsfrei möglich, die Lokalisierung der Isoformen aufgrund der Zuordnung in den Expressionsdaten festzustellen. Allgemein wurde eine höhere Aktivität in den Chloroplasten als im Cytosol berechnet. Jedoch ist nicht sicher, ob es sich in den Chloroplasten um drei unterschiedliche Isoformen handelt. Nach den Expressionsdaten geht die größte SuSy-Aktivität im Wildtyp von der Saccharose Synthase 2 und die geringste von dem dritten Isoenzym aus. Bei weiteren Analysen wurde in Erfahrung gebracht, dass vor allem SuSy 1 und 3 im Erbsensamen und die zweite Isoform eher in jungen Blättern und älteren Samenhüllen lokalisiert ist [Barrat *et al.*, 2001]. Daher ist unklar, ob die berechneten Teilaktivitäten korrekt sind. Über SuSy 1 kann keine genauen Aussagen getroffen werden, da sie dreimal im Microarray vorkam und die Messwerte zu verschieden waren. Wahrscheinlich sind aber alle drei Isoformen im Cytoplasma vorhanden [Weigelt *et al.*, 2009].

Die UGPase konnte anhand weiterer Untersuchungen im Cytosol lokalisiert werden [Weigelt *et al.*, 2009]. Allerdings lieferten WoLF PSORT und TargetP etwa dieselben Ergebnisse zum Vorkommen der UGPase 2 in Nuclei. Die Resultate zu UGPase 5 waren eher ungenau. Daher könnte die UGPase 2 in Nuclei und die UGPase 5 im Cytosol lokalisiert sein. Das bedeutet, dass im Wildtyp die Aktivitäten auf Cytosol und Nuclei etwa gleichverteilt sind und im transgenen Erbsenembyro eventuell eine größere Aktivität vom Cytosol ausgehen könnte. Es wäre aber auch möglich, dass beide Isoenzyme im Cytosol existieren. Demnach würden die katalytischen Reaktionen mit maximaler Aktivität dort stattfinden.

Beim Vergleich aller Ergebnisse fällt jedochs auf, dass mithilfe der Expressionsdaten nur beschränkt auf die Verteilung der Enzymaktivitäten geschlossen werden kann. Mit WoLF PSORT und TargetP war es nicht möglich, eindeutig die Isoenzyme bestimmten Kompartimenten der Zelle zuzuordnen, denn sie lieferten meist sehr widersprüchliche Resultate. Nur durch Literaturrecherche konnte die subzelluläre Verteilung einiger Enzyme ermittelt werden. Allerdings waren wahrscheinlich nicht alle Isoformen in den

Expressionsdaten aufgeführt, sodass die Verteilung der Enzymaktivitäten womöglich fehlerhaft ist. Außerdem spielen bei der Transkription viele Faktoren eine wichtige Rolle. Die Expressionsstärke ist zum Beispiel vom Erntezeitpunkt, von Temperatur und vom Entwicklungsstadium abhängig. Durch verschiedene Proben werden dadurch die Messungen verfälscht und es können keine genauen Ergebnisse erzielt werden. Des Weiteren wurden aus den Microarray-Proben (20-35 DAF) die Proben mit 20 DAF verwendet, da sie am besten mit den Assay-Proben übereinstimmten, deren mittlerer Erntezeitpunkt bei etwa 21 DAF lag. Daher könnten sich die Erbsensamen in verschiedenen Entwicklungsstadien befinden und dabei charakteristische Unterschiede zeigen. Die Assay-Messungen erwiesen sich infolge geringerer Messschwankungen als wesentlich zuverlässiger. Diese unterlagen zwar den gleichen Einflüssen, jedoch wurde jedes Enzym-Assay mehrere Male durchgeführt und daraus ein Aktivitätsmittelwert mit meist geringer Standardabweichung erzielt. Allerdings konnte hier nur ein Trend zu höheren beziehungsweise niedrigeren Aktivitäten der Enzyme und keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Darüber hinaus könnten im Microarray nicht alle im Samen enthaltenen Isoenzyme, vorkommen, die für diese Arbeit von Interesse sind, da nicht die gesamten Sequenzen bekannt sind. Weiterhin gab es einige widersprüchliche Zuordnungen der Enzyme, z. B. von PGI. Laut den Expressionsdaten gab es nur eine Isoform, welche im Cytosol lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu wurden 1992 durch Foster & Smith publiziert, dass Aktivitäten von PGI in Plastiden gemessen wurden. Daher konnte PGI und somit sein  $v_{max}$  keinem Kompartiment eindeutig zugeordnet werden.

Der in Tabelle 5 dargestellte M-Wert zeigte kaum Übereinstimmungen mit den gemessenen Ergebnissen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass nicht von der Expressionsstärke auf die jeweils maximale Enzymaktivität geschlossen werden kann. Nicht aus jedem exprimierten Gen wird zwangsweise ein Protein hergestellt [Hajduch *et al.*, 2010], welches zum Teil auch inaktiv oder beschädigt sein kann. Darüber hinaus ist die Proteindegradation ein wichtiger Faktor für den Vergleich von Aktivität und Expressionsstärke, der nicht berücksichtigt werden konnte. Enzymaktivitäten können auch durch äußere Faktoren beeinflusst werden, z. B. durch Substrat- oder Produkthemmungen sowie weitere Inhibierungen. Außerdem nimmt ein aktives Protein nicht automatisch an einer bestimmten Reaktion teil, was bedeutet, dass  $v_{max}$  nicht unbedingt mit der Proteinmenge und diese nicht mit der Expressionsstärke korreliert.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Unterschiede des Saccharoseabbau und der Stärkesynthese im Erbsen-Wildtyp und ihrer transgenen Form, der RNAi AGP3, untersucht. Hierfür wurden Assays für die einzelnen Enzyme erstellt und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Es zeigten sich wesentliche Veränderungen des Metabolismus im transgenen Erbsenembryo. Signifikante Unterschiede sind zum Beispiel bei der Aktivität der AGPase zu sehen, da eine Interferenz in der RNA des Enzyms vorgenommen und somit seine Aktivität herabgesetzt wurde. Desweiteren ist ein Trend zur Abnahme der iPPase-Aktivität und zur Zunahme der Phosphoglucomutase- und Saccharose-Synthase-Aktivität zu erkennen. Bei den anderen Enzymen wurden ebenfalls geringe Unterschiede gemessen. Um aber eine statistische Signifikanz bzw. einen Trend festzustellen, werden weitere Tests benötigt.

Ähnliche Veränderungen waren auch in der Expressionsstärke der einzelnen Isoenzyme sichtbar. Allerdings stimmten nicht alle Unterschiede mit den gemessenen Aktivitäten überein. Beispielsweise wurde ein positiver M-Wert für die Invertase berechnet. Dies bedeutet, dass die Signalstärke im Microarray und damit die Expression in der transgenen Erbse größer als in der Wildform war. Ähnliches wurde auch für die UGPase ermittelt. Somit war es auch nicht möglich, Expressionsverhältnisse der gefundenen Isoformen zu bilden und diese anschließend eindeutig auf  $v_{max}$  zu beziehen. Die Expression der Gene kann durch viele Faktoren beeinflusst werden, daher gab es auch für jedes Isoenzym starke Abweichungen der Expressionswerte.

Außerdem sollte mithilfe der beiden Onlinetools, WoLF PSORT und TargetP 1.1, die Lokalisierung der verschiedenen Isoformen bestimmt werden. Dafür wurden die Oligonukleotid-Sequenzen des Microarrays verwendet, um in Datenbanken nach längeren Erbsensequenzen zu suchen. Diese wurden daraufhin in beide Tools eingesetzt. Allerdings konnte diese Methode keine genauen Resultate liefern. Durch weitere Literaturrecherchen war es möglich, teilweise einzelne Enzyme in Kompartimenten der Zelle einzuordnen. Da das Genom der Erbse noch nicht vollständig sequenziert wurde, sind viele Enzymsequenzen unvollständig. Sobald diese in gesamter Form vorliegen, wäre es später möglich durch TargetP und WoLF PSORT die Enzymisoformen den Zellorganellen zuzuordnen. Zudem ist die Expression der Gene gegenüber Einflüssen sehr empfindlich

und kann daher nicht unbedingt für die Vorhersage der Aktivitätsverteilung verwendet werden. Deshalb sollte für eindeutigere Ergebnisse auf andere Vorgehensweisen zugegriffen werden, beispielsweise die Aktivitätsmessung der einzelnen Kompartimente, die durch nichtwässrige Fraktionierung bestimmt werden.

Zudem werden in naher Zukunft die kinetischen Parameter weiterer Enzyme vor allem der Stärkesynthese aber auch Enzyme anderer Stoffwechselwege in der Erbse untersucht. Da viele Enzyme nicht nur in eine Richtung eine Reaktion katalysieren, werden außerdem die Parameter der Umkehrreaktionen bestimmt und für mathematische Modelle verwendet. Zusätzlich sollen die bereits untersuchten Enzyme analysiert werden, um eine weitere Inhibierung festzustellen. Weiterhin werden für die Fructose-phosphorylierende Aktivität der Hexokinase der exakte Inhibierungstyp und der dazugehörige  $K_I$ -Wert ermittelt.

## Literaturverzeichnis

[URL-1] Wuerzner, H.: Informationen zur Verwendung von importierter Soja bzw.

Sojaextraktionsschrot als Futtermittel. URL:

<<http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/gvo/soja-futtermittel/>>, verfügbar am 31.05.2011

[URL-2] Verfasser unbekannt: Europa bleibt vom Soja abhängig. URL:

<<http://www.agrarheute.com/europa-bleibt-vom-soja-abhaengig>>, verfügbar am 31.05.2011

[URL-3] Verfasser unbekannt: Ursprung der wichtigsten Kulturpflanzen.

URL:<<http://www.anhalonium.com/d/hekuzentr.htm>>, verfügbar am 30.05.2011

[URL-4] Verfasser unbekannt: Erbse.

URL:<[http://www.transgen.de/lexikon\\_nutzpflanzen/10.erbse.html](http://www.transgen.de/lexikon_nutzpflanzen/10.erbse.html)>, verfügbar 18.05.2011

[URL-5] Verfasser unbekannt: The *Rhizobium*-Legume Symbiosis.

URL:<<http://www2.toulouse.inra.fr/centre/lbmrpm/eng/symbiose.htm>>, verfügbar am 04.07.2011

[URL-6] W. Hübl <[med4you@compuserve.at](mailto:med4you@compuserve.at)>: Enzyme und enzymatische Techniken in der Labormedizin. URL:

<[http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/enzyme/mich\\_konst.gif](http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/enzyme/mich_konst.gif)>, verfügbar am 03.06.2011

[URL-7] Schmoock, S. <[silvia.schmoock@botanik.uni-hannover.de](mailto:silvia.schmoock@botanik.uni-hannover.de)>: Posttranskriptionales Gene Silencing. Ein Abwehrmechanismus von Pflanzen gegenüber phytopathogenen Viren.

URL:<[www.Fsbio-hannover.de/oftheweek/123.htm](http://www.Fsbio-hannover.de/oftheweek/123.htm)>, verfügbar am 14.07.2011

[URL-8] Verfasser unbekannt: DNA-Microarray.

URL:<<http://www.biosicherheit.de/lexikon/841.dna-microarray.html>>, verfügbar am 13.07.2011

[URL-9] Verfasser unbekannt < tech@jacksonimmuno.com>: Technical Information on Probes Conjugated to Affinity-Purified Antibodies and to Other Proteins: Cyanine Dyes (Cy2, Cy3, and Cy5). URL:<<http://www.jacksonimmuno.com/technical/f-cy3-5.asp>>, verfügbar am 18.07.2011

[URL-10] Verfasser unbekannt: ESTs: Gene Discovery made easier.  
URL:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html>>, verfügbar am 04.08.2011

[URL-11] Ludwig-Mayerhofen, W.: Signifikanztests (statistische Hypothesentests).  
URL:<[http://www.fb1.uni-siegen.de/soziologie/mitarbeiter/ludwig-mayerhofer/statistik/statistik\\_downloads/statistik\\_ii\\_5.pdf](http://www.fb1.uni-siegen.de/soziologie/mitarbeiter/ludwig-mayerhofer/statistik/statistik_downloads/statistik_ii_5.pdf)>, verfügbar am 10.08.2011

[URL-12] Verfasser unbekannt: About WoLF PSORT.  
URL:<[http://wolfpsort.org/aboutWoLF\\_PSORT.html.en](http://wolfpsort.org/aboutWoLF_PSORT.html.en)>, verfügbar am 21.07.2011

[URL-13] Verfasser unbekannt:  
URL:<[http://wolfpsort.org/results/pGT3de4b3ff2251630ba3e8a34145ca8af5.detailed1.html#Ps200709\\_Contig020110](http://wolfpsort.org/results/pGT3de4b3ff2251630ba3e8a34145ca8af5.detailed1.html#Ps200709_Contig020110)>, verfügbar am 27.07.2011

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410

Barrat, D. H. P., Barber, L., Kruger, N. J., Smith, A. M., Wang, T. L., Martin, C. (2001) Multiple, Distinct Isoforms of Saccharose Synthase in Pea<sup>1</sup>. *Plant Physiology*, 127: 655-664

Bisswanger, H.: *Enzyme Kinetics. Principles and Methods*. 2. Auflage, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008

Borisjuk, L., Rolletscheck, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U., Weber, H. (2003) Seed Development and Differentiation: A Role for Metabolic Regulation. *Plant Biology*, 6: 375-386

Burgess, D., Penton, A., Dunsmuir, P., Dooner, H. (1997) Molecular cloning and characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase cDNA clones isolated from pea cotyledons. *Plant Molecular Biology*, 33: 431-444

Casey, R., Davies, D. R.: *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*. 1. Auflage, Wallingford, CAB International, 1993

- Claeysen, E., Rivoal, J. (2007) Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochemistry*, 68: 709-731
- Copeland, L., Stone, S. R., Turner, J. F. (1984) Kinetic Studies of Fructokinase I of Pea Seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 233: 748-760
- Cosio, E., Bustamante, E. (1984) Subcellular Localization of Hexokinase in Pea Leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 7688-7692
- Craig, J., Barrat, P., Tatge, H., Déjardin, A., Handley, L., Gardner, C. D., Barber, L., Wang, T., Hedley, C., Martin, C., Smith, A. M. (1999) Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *The Plant Journal*, 17: 353-362
- Deng, W., Nickle, D. C., Learn, G. H., Maust, B., Mullins, J. I. (2007) ViroBLAST: a stand-alone BLAST web server for flexible queries of multiple databases and user's datasets. *Bioinformatics*, 23: 2334-2336
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Pühler, A., Meyer, F. (2003) EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *Journal of Biotechnology*, 106: 135-146
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*, 2: 953-971
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000) Prediction Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300: 1005-1016
- Farré, E. M.: Compartmentation in potato tubers. Universität Potsdam, Dissertation, 2001
- Franssen, S. U., Shrestha, R. P., Bräutigam, A., Bornberg-Bauer, E., Weber, A. P. M. (2011) Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing. *BMC Genomics*, 12: 227-242
- Foster, J. M., Smith, A. M. (1993) Metabolism of glucose 6-phosphate by plastids from developing pea embryos. *Planta*, 190: 17-24

- Fotopoulos, V. (2005) Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *Journal of Biological Research*, 4: 127-137
- Giese, J.: Molekulare und biochemischer Charakterisierung der Hexokinase-Genfamilie von *Nicotiana tabacum*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation, 2005
- Gross, P., ap Rees, T. (1986) Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta*, 167: 140-145
- Guglielminetti, L., Perata, P., Morita, A., Loreti, E., Yamaguchi, J., Alpi, A. (2000) Characterization of isoform of hexose kinases in rice embryo. *Phytochemistry*, 53: 195-200
- Hajduch, M., Hearne, L. B., Miernyk, J. A., Casteel, J. E., Joshi, T., Agrawal, G. K., Song, Z., Zhou, M., Xu, D., Thelen, J. J. (2010) Systems Analysis of Seed Filling in *Arabidopsis*: Using General Linear Modeling to Assess Concordance of Transcript and Protein Expression. *Plant Physiology*, 152: 2078-2087
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Nakai, K. (2006) Protein Subcellular Localization Prediction with WoLF PSORT. *Proceedings of Asian Pacific Bioinformatics Conference APBC06, Taipei*: 39-48
- Kingston-Smith, A. H., Galtier, N., Pollock, C. J., Foyer, C. H. (1998) Soluble acid invertase activity in leaves is independent of species differences in leaf carbohydrates, diurnal sugar profiles and paths of phloem loading. *New Phytologist*, 139: 283-292
- Kleczkowski, L. A., Martz, F., Wilczynska, M. (2005) Factors affecting oligomerization status of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Phytochemistry*, 66: 2815-2821
- Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P.: *Biostatistik. Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler*. 4. Auflage, Berlin, Springer-Verlag, 2007
- Kurreck, J. (2007) Cosackievirus. RNA-Interferenz als antivirale Strategie. *BIOspektrum*, 3: 265-267
- Lu, R., Lee, G., Schultz, M., Dardick, C., Jung, K., Phetsom, J., Jia, Y., Rice, R. H., Goldberg, Z., Schnable, P. S., Ronald, P., Rocke, D. M. (2008) Assessing probe-specific dye and slide biases in two-color microarray data. *BMC Bioinformatics*, 9: 314-321



- McKibbin, R. S., Muttucumaru, N., Paul, M. J., Powers, S. J., Burrell, M. M., Coates, S., Purcell, P. C., Tiessen, A., Geigenberger, P., Halford, N. G. (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnology Journal*, 4: 409-418
- Munier-Jolain, N., Biarnès, V., Chaillet, I., Lecoœur, J., Jeuffroy, M., Carrouée, B., Crozat, Y., Guilioni, L., Lejeune, I., Tivoli, B.: *Physiology of the Pea Crop*. 1. Auflage, Enfield, Science Publishers, 2010
- Nguyen, N., Williams, E. R. (2006) Experimental design for 2-colour cDNA microarray experiments. *Applied Stochastic Models in Business and Industry*, 22: 631-638
- Nwokolo, E., Smartt, J.: *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. 1. Auflage, London, Chapman & Hall, 1996
- Radchuk, R.: *Regulation of seed development in Leguminosae: investigation the role of SNF1-related protein kinase*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation, 2005
- Rohwer, J. M., Botha, F. C. (2001) Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data. *Biochemical Journal*, 358: 437-455
- Schaffer, A.A., Petreikov, M. (1997) Saccharose-to-Starch Metabolism in Tomato Fruit Undergoing Transient Starch Accumulation<sup>1</sup>. *Plant Physiology*, 113: 739-746
- Schepers, U.: *RNA Interference in Practice. Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in C. elegans, Drosophila, and Mammals*. 1. Auflage, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004
- Smith, A. M., Bettey, M., Bedford, J. D. (1989) Evidence that the *rb* Locus Alters the Starch Content of Developing Pea Embryos through an Effect on ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiology*, 89: 1279-1284
- Smith, A. M., Denyer, K., Martin, C. R. (1995) What Controls the Amount and Structure of Starch in Storage Organs. *Plant Physiology*, 107: 673-677
- Turner, J. F., Copeland, L. (1981) Hexokinase II of Pea Seeds. *Plant Physiology*, 68: 1123-1127

- Ulrich, C. M., Bigler, J., Velicer, C. M., Greene, E. A., Farin, F. M., Potter, J. D. (2000) Searching Expressed Sequence Tag Databases: Discovery and Confirmation of a Common Polymorphism in the *Thymidylate Synthase* Gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9: 1381-1385
- Uys, L., Botha, F. C., Hofmeyr, J. S., Rohwer, J. M. (2007) Kinetic model of sucrose accumulation in maturing sugarcane culm tissue. *Phytochemistry*, 68: 2375-2392
- Vianello, A., Zancani, M., Braidot, E., Petrusa, E., Macrì, F. (1991) Proton pumping inorganic phosphatase of pea stem submitochondrial particles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1060: 299-302
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U. (2005) Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 253-279
- Weber, H., Heim, U., Borisjuk, L., Wobus, U. (1995) Cell-type specific, coordinate expression of two ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba* L.. *Planta*, 195: 352-361
- Weigelt, K.: Transkriptionelle und biochemische Untersuchungen des veränderten Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus in genetisch modifizierten Erbsensamen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation, 2010
- Weigelt, K., Küster, H., Rutten, T., Fait, A., Fernie, A. R., Miersch, O., Wasternack, C., Emery, R. J. N., Desel, C., Hosein, F., Müller, M., Saalbach, I., Weber, H. (2009) ADP-Glucose Pyrophosphorylase-Deficient Pea Embryos Reveal Specific Metabolism and Stress Responses. *Plant Physiology*, 149: 395-411

## **Anhang**

## Anhang A: Grundlagen

In der Tabelle A.1 sind drei Inhibierungswege veranschaulicht: Die kompetitive, die unkompetitive und die nicht-kompetitive Inhibierung. Bei jedem Inhibierungstyp ist das Enzym E in der Lage mit dem Substrat A über die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  einen Enzym-Substrat-Komplex (EA) zu bilden. Dieser kann entweder über die Konstante  $k_{-1}$  wieder zu E und A zerfallen oder das Substrat wird mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  zu einem Produkt umgesetzt, welches anschließend abgespalten wird.

Bei der kompetitiven Hemmung ist das Enzym fähig mit einem Inhibitor I zu reagieren, wobei ein Komplex (EI) entsteht, an den das Substrat nicht binden kann. Die unkompetitive Inhibierung ist durch eine zusätzliche Bindung des Inhibitors an EA gekennzeichnet. Somit wird ebenfalls die Substratumwandlung und Produktabspaltung nicht ermöglicht. Bei der nicht-kompetitiven Inhibierung, die sich aus den zwei vorhergehenden Prozessen zusammensetzt, kann EI zusätzlich mit dem Substrat einen Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex bilden. Auch hier kommt es zu keiner Umsetzung.

Tabelle A.1: Zusammenfassung drei verschiedener Inhibierungsarten mit Fließschemen und Ratengleichungen (modifiziert nach Bisswanger, 2008). Hier werden drei verschiedene Inhibierungsmöglichkeiten sowie deren Fließschemen und Ratengleichungen veranschaulicht. Die Ratengleichung der unkompetitiven Hemmung wurde für die Berechnung der Fructose-phosphorylierenden Aktivität der Hexokinase verwendet.

Inhibierungsart	Fließschema	Ratengleichungen
kompetitive Inhibierung	$  \begin{array}{c}  E + A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EA \xrightarrow{k_2} E + P \\  + \\  I \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} EI + A  \end{array}  $	$v = \frac{V[A]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [A]}$
unkompetitive Inhibierung	$  \begin{array}{c}  E + A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EA \xrightarrow{k_2} E + P \\  + \\  I \xrightleftharpoons[k_{-4}]{k_4} EAI  \end{array}  $	$v = \frac{V[A]}{K_M + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right) [A]}$
nicht-kompetitive Inhibierung	$  \begin{array}{c}  E + A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EA \xrightarrow{k_2} E + P \\  + \qquad \qquad + \\  I \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} EI + A \xrightleftharpoons[k_{-5}]{k_5} EAI  \end{array}  $	$v = \frac{V[A]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right) [A]}$

Abbildung A.1 zeigt den Vektor, der für die Herstellung der RNAi AGP3 verwendet wurde. Ein 550 bp langes AGPase-Fragment wurde mittels RT-PCR amplifiziert und durch *sense* und *antisense* Richtung zu einem Hairpin-Konstrukt zusammengeführt. Dieses wurde in den unter Abbildung A.1 dargestellten Vektor und anschließend in *Pisum sativum* überführt [Weigelt, 2010].

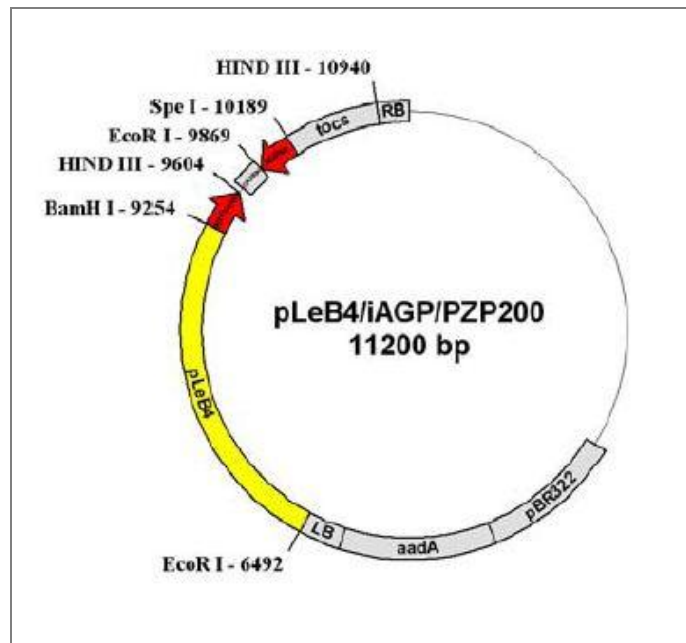


Abbildung A.1: Schema des Binärvektors PZP200 mit eingefügtem Konstrukt. Das AGPase-Fragment wurde durch RT-PCR amplifiziert und in *sense* und *antisense* Richtung zusammengeführt, wobei es durch das Intron Gibberellin-20-Oxidase-Gen getrennt wird. Außerdem steht es unter Kontrolle des LeB4-Promotors. Die Abbildung wurde aus Weigelt (2010) (Abbildung A.2) entnommen.

Unter Abbildung A.2 wird ein Beispiel zu einem MA-Plot veranschaulicht, welches auf Grundlage eines 2-Farben-Microarrays erstellt wurde.

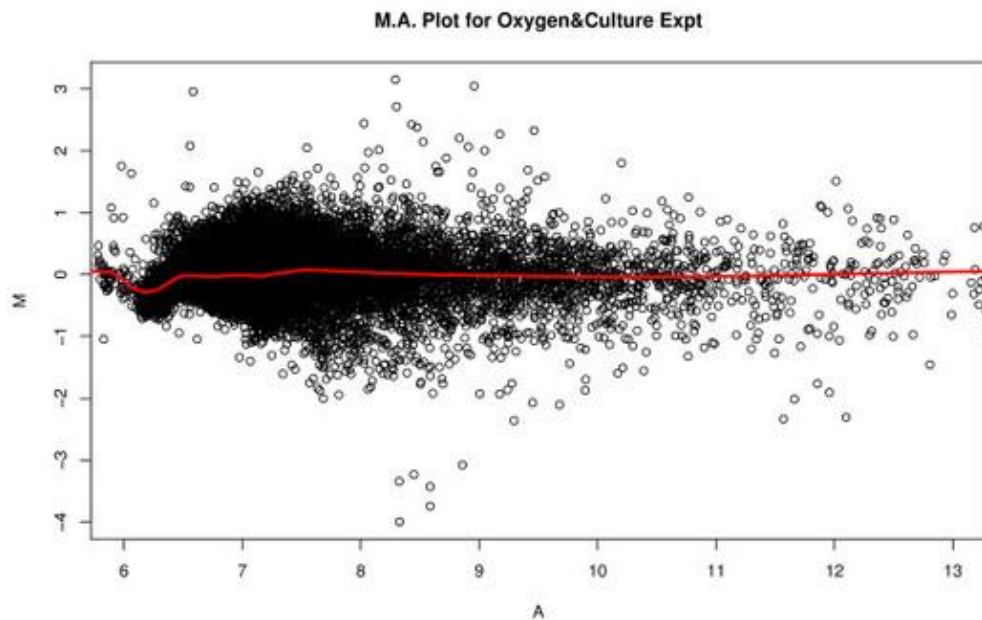


Abbildung A.2: MA-Diagramm eines 2-Farben-Microarrays. In diesem Diagramm wird der M-Wert in Abhängigkeit von A dargestellt. Der M-Wert ist das logarithmische Intensitätsverhältnis der zwei verschiedenen Signale im Microarray. A definiert sich durch den logarithmischen Mittelwert der Farbintensität [Abbildung siehe Lu *et al.*, 2008].

## Anhang B: Ergebnisse

Nach mehreren Messungen der Fructose-phosphorylierenden Aktivität der Hexokinase fiel auf, dass eine Substratinhibierung auftrat. Daraufhin wurde mit höheren Substratkonzentrationen gemessen, um die Art der Hemmung festzustellen. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung B.1 dargestellt.

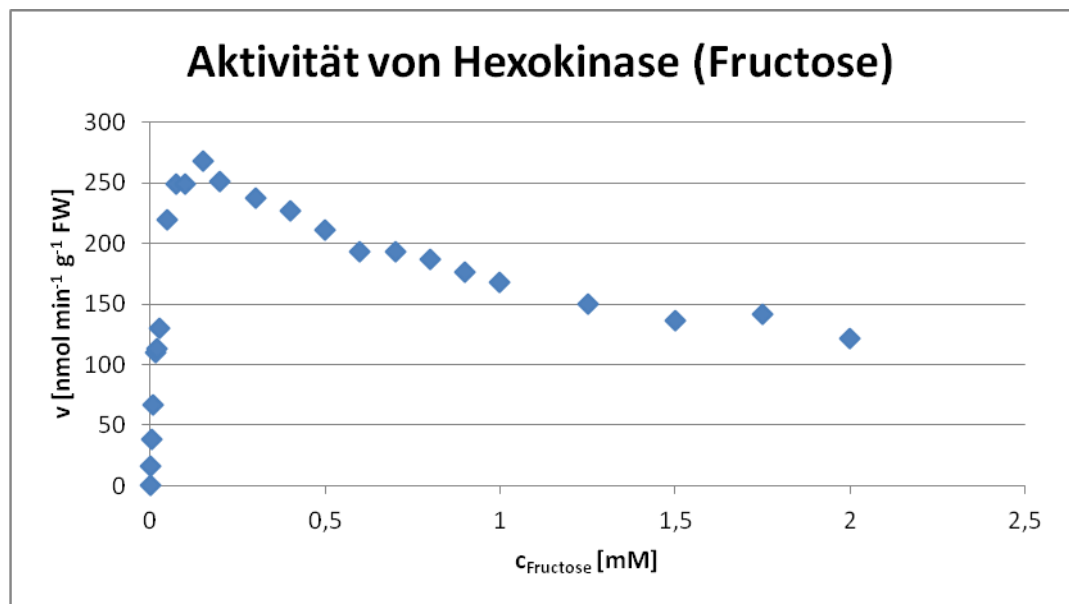


Abbildung B.1: Unkompetitive Hemmung der Hexokinase (Fructose). Blau stellt die gemessene Reaktionsgeschwindigkeiten der Hexokinase in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration dar. Diese Abbildung zeigt deutlich, dass nach etwa 0,2 mM die Aktivität stark abnimmt und diese wahrscheinlich bei sehr hohen Substratkonzentrationen gegen Null geht.



Zur Beurteilung der Signifikanz wurden mittels t-Test die Prüfstatistiken der Versuchsdaten

$t_{Vers}$  und der kritische Wert  $t_{krit}$  der  $v_{max}$ -Ergebnisse miteinander verglichen (siehe Tabelle B.1). Ist der Betrag von  $t_{Vers}$  größer als der kritische Wert, so sind die Unterschiede der Versuchsdaten von WT Eiffel und RNAi AGP3 signifikant. Dies verdeutlicht auch die Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 %. Trifft dies nicht zu, kann nur von einem Trend der Werte gesprochen werden. In Tabelle B.2 sind  $t_{Vers}$  und  $t_{krit}$  der  $K_M$ -Werte gegenübergestellt.

Tabelle B.1: Gegenüberstellung von  $t_{Vers}$  und  $t_{krit}$  ( $v_{max}$ ). Mit dem Vergleich der Werte kann die statistische Signifikanz der Messdaten beurteilt werden. Die Unterschiede der AGPase-Ergebnisse sind signifikant, alle anderen folgen jeweils nur einem Trend. Gleiches zeigt auch die Irrtumswahrscheinlichkeit P.

Enzymname	$t_{Vers}$	$t_{krit}$	p (%)
AGPase	13,73	2,36	2,6E-04
Hexokinase (Glc)	-0,12	2,10	91
Hexokinase (Frc)	0,46	2,07	65
Invertase (alk)	1,22	2,20	25
iPPase	0,79	2,14	44
PGI	-0,83	2,11	42
PGM	-1,42	2,14	18
SuSy	-1,28	2,23	23
UGPase	0,45	2,12	66

Tabelle B.2: Vergleich von  $t_{Vers}$  und  $t_{krit}$  ( $K_M$ ). Die Unterschiede der  $K_M$ -Werte von AGPase sind statistisch signifikant. Die Werte der iPPase verfolgen einen deutlichen Trend. Wie in Tabelle B.1 sind auch die Irrtumswahrscheinlichkeiten dargestellt.

Enzymname	$t_{Vers}$	$t_{krit}$	p (%)
AGPase	-6,87	2,31	0,01
Hexokinase (Glc)	0,24	2,13	82
Hexokinase (Frc)	0,61	2,07	55
Invertase (alk)	-0,80	2,20	44
iPPase	2,08	2,14	6
PGI	-0,75	2,13	47
PGM	-0,33	2,14	75
SuSy	0,89	2,18	39
UGPase	0,90	2,23	39

Tabelle B.3 zeigt die prozentuale Verteilung der experimentell ermittelten Aktivitäten. Diese wurde mithilfe der Signalstärke des verwendeten Microarrays berechnet.

Tabelle B.3: Aktivitäten der Enzyme bzw. ihrer Isoformen, prozentual angegeben

Name	Isoform	Prozentual %	
		WT Eiffel	RNAi AGP3
AGPase	AGPase große Kette	33,3	36,8
	AGPase 1	66,7	63,2
Hexokinase	HK 6	100	100
Invertase	Inv	100	100
iPPase	vakuolär	11,9	13,1
	iPPase	32,5	24,5
	iPPase 1	12,7	10,6
	vakuoläre iPPase	43	51,8
PGI	cytosolisch	100	100
PGM	cytosolisch	13,2	22,8
	chloroplastisch	40,6	31,4
	chloroplastisch	40,9	39,9
	chloroplastisch	5,2	5,9
SuSy	SuSy 1	20,9	26
	SuSy 3	8,9	3,2
	SuSy 2	36,3	9,5
	SuSy 1	25,5	48,9
	SuSy 1	8,4	12,4
UGPase	UGPase 2	51,5	40,1
	UGPase 5	48,5	59,9

In der Tabelle B.4 wird die mithilfe von WoLF PSORT ermittelten Verteilungen der Enzyme in der Zelle dargestellt. Ein anderes Werkzeug (TargetP 1.1) zur Ermittlung der Präferenz der Enzyme zu bestimmten Kompartimenten wird in Tabelle B.5 zusammengefasst.

Tabelle B.4: Voraussage der Verteilung auf die verschiedenen Kompartimente der Zelle mittels WoLF PSORT. Hier werden die Präferenzen der subzellulären Verteilung in der Zelle dargestellt. Die Zahlen stehen für die Wichtung der Präferenz zu den einzelnen Kompartimenten. WoLF PSORT arbeitet auf der Grundlage des kNN-Algorithmus (k-Nearst Neighbors, k-nächste Nachbarn) [Horton *et al.*, 2006]. Hier werden die 14 nächsten Nachbarn und ihre subzelluläre Verteilung aus Datenbanken wie SWISS-PROT herausgesucht und für jedes Kompartiment addiert. Das heißt die Summe aller Kompartimente ergibt stets 14 [Horton *et al.*, 2006]. Abkürzungen: plas, Plasmamembran; mito, Mitochondium; vacu, vakuoläre Membran; extr, extrazellulär; nucl, Nucleus; chlo, Chloroplast; cyto, Cytosol; E.R. plas, Plasmamembran des Endoplasmatischen Retikulums; E. R., Endoplasmatisches Retikulum; golg, Golgi-Apparat [URL-12].

<b>WoLF PSORT</b>	<b>Isoform</b>	<b>plas</b>	<b>mito</b>	<b>vacu</b>	<b>extr</b>	<b>nucl</b>	<b>chlo</b>	<b>cyto</b>	<b>E. R. plas</b>	<b>E. R.</b>	<b>golg</b>
AGPase	große Kette	4	3	3	2	1		1			
	AGPase 1		7			5	1			1	
Hexokinase	HK 6		5		1	6		2			
Invertase	Inv		5		1	6		2			
iPPase	iPPase		6		1	5		2			
	iPPase 1		5		2	6		1			
SuSy	SuSy 1	1	6		1	5				1	
	SuSy 3		1		1	5	7				
	SuSy 2	1	5		1	5			1	1	
	SuSy 1		5		1	5		3			
	SuSy 1		5		1	5		3			
UGPase	UGPase 2		3		1	5	3	2			
	UGPase 5		5		1	6		2			

Tabelle B.5: Vorhersage der subzellulären Enzymverteilung mittels TargetP 1.1. TargetP berechnet anhand des N-Terminus die Präferenz zu einzelnen Kompartimenten der Zelle. Die Tabelle gibt einen Überblick über die Längen der Sequenzen (Len), über den Lokus und über die Bewertung (RC: Zuverlässigkeitsklasse). Dabei steht cTP für Chloroplast-Transitpeptid, mTP für mitochondriales Zielpeptid und SP für Signalpeptid. Differenzen zwischen den Werten von kleiner 0,2 werden mit 5, zwischen 0,2 und 0,4 mit 4, von 0,4 bis 0,6 mit 3, von 0,6 bis 0,8 mit 2 und größer 0,8 mit 1 bewertet. Dabei deutet 1 auf die genaueste Vorhersage und 5 auf die ungenaueste. Unter Loc werden dann die Präferenzen angegeben. Abkürzungen: S, sekretorischer Weg, z. B. Endoplasmatisches Retikulum, Vesikel oder Golgi Apparat; C, Chloroplast; M, Mitochondrium; \_ , andere Kompartimente wie Cytosol oder Vakuole [Emanuelsson *et al.*, 2007].

TargetP	Isoform	Len	cTP	mTP	SP	andere	Loc	RC
AGPase	AGPase große Kette	1911	0,139	0,026	0,604	0,03	S	3
	AGPase 1	2177	0,501	0,073	0,002	0,611	_	5
Hexokinase	HK 6	1151	0,277	0,225	0,052	0,282	_	5
Invertase	Inv	1163	0,272	0,113	0,05	0,407	_	5
iPPase	iPPase	1036	0,147	0,121	0,019	0,556	_	3
	iPPase 1	856	0,154	0,044	0,589	0,057	S	3
SuSy	SuSy 1	2652	0,334	0,16	0,041	0,415	_	5
	SuSy 3	338	0,245	0,066	0,023	0,459	_	4
	SuSy 2	2880	0,514	0,035	0,159	0,083	C	4
	SuSy 1	1835	0,282	0,143	0,034	0,552	_	4
	SuSy 1	1835	0,282	0,143	0,034	0,552	_	4
UGPase	UGPase 2	1118	0,048	0,105	0,293	0,26	S	5
	UGPase 5	1885	0,32	0,029	0,095	0,329	_	5

## Anhang C: Diskussion

In Abbildung C.1 sind die zwei Hexosen, Fructose und Glucose, in ihrer üblichen Form dargestellt. Fructose verfügt im Vergleich zu Glucose über einen Fünfring, wohingegen Glucose größtenteils als Sechsring vorkommt.

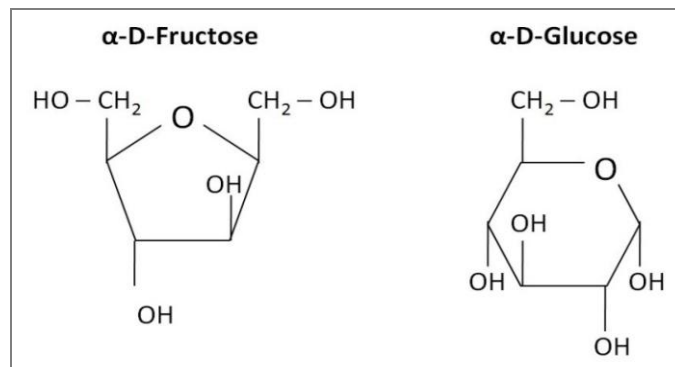


Abbildung C.1: Strukturformeln von Fructose und Glucose. Die am häufigsten auftretende Form ist der Fünfring für Fructose und der Sechsring für Glucose. Für die Fructose existiert ebenfalls eine Sechsring- und für die Glucose eine Fünfringform. Beide Einfachzucker können auch als offene Kette vorliegen.

Abbildung C.2 zeigt die Ergebnisse aus WoLF PSORT für die AGPase. Insgesamt 14 Nachbarn wurden aufgelistet.

Ps200709_Contig020110 WoLFPSORT prediction mito: 7.0, nucl: 5.0, chlo: 1.0				
<a href="#">PSORT features and traditional PSORTII prediction</a>				
14 Nearest Neighbors				
id	site	distance	identity	comments
CYC_SOLTU	mito	744.8	1% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Mitochondrial matrix.
CYC_CHLRE	mito	748.8	2% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Mitochondrial matrix.
NCPR_CATRO	E.R.	752.3	5% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Endoplasmic reticulum. Anchored to the ER membrane by its N-terminal hydrophobic region.
At4g27580.1	mito	754.2	1% <a href="#">[Arath]</a>	
ADT_CHLRE	mito	755.9	3% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Integral membrane protein. Mitochondrial inner membrane.
CYC_LYCES	mito	756.1	1% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Mitochondrial matrix.
CYC_ACENE	mito	762.3	1% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Mitochondrial matrix.
H11_VOLCA	nucl	763.3	3% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Nuclear.
H1_MAIZE	nucl	770.2	3% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Nuclear.
H1_LYCPN	nucl	774.4	2% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Nuclear.
H1_LYCES	nucl	778.9	3% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Nuclear.
CB2_DUNSA	chlo	784.4	3% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Chloroplast thylakoid membrane.
CYC_HELAN	mito	785.9	1% <a href="#">[Uniprot]</a>	SWISS-PROT45:Mitochondrial matrix.
At2g33610.1	nucl	788.6	3% <a href="#">[Arath]</a>	

Abbildung C.2: Ergebnisse von WoLF PSORT zur Sequenz von AGPase 1. Die zu untersuchende Sequenz weist nur geringe Übereinstimmungen auf. Häufig handelt es sich um Identitäten von unter 5 % . Auf dieser Grundlage kann daher kein sinnvolles Ergebnis aufgebaut werden [URL-13].

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt haben.

Mittweida, 12.09.2011

